

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
ИМЕНИ М. В. ЛОМОНОСОВА

---

ФИЗИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

  
*На правах рукописи*

УДК 577.352.465

**МАРКОВ Илья Владимирович**

**L- И D-ИЗОМЕРЫ ТРАНСМЕМБРАННЫХ КАНАЛОВ.  
СТРУКТУРА И СЕЛЕКТИВНОСТЬ**

Специальность 03.00.02 – биофизика

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата физико-математических наук

Москва – 2006

Работа выполнена на кафедре естественнонаучных дисциплин  
Липецкого филиала Орловской региональной академии государственной службы

- Научный руководитель:** кандидат химических наук, кандидат физико-математических наук,  
доцент  
Дмитриев Андрей Викторович
- Научный консультант:** доктор физико-математических наук  
профессор  
Твердислов Всеволод Александрович
- Официальные оппоненты:** доктор физико-математических наук,  
ведущий научный сотрудник  
Быстров Владимир Сергеевич
- кандидат физико-математических наук,  
старший научный сотрудник  
Яковенко Леонид Владимирович
- Ведущая организация:** Институт биохимической физики им.  
Н.М. Эмануэля РАН

Защита состоится 16 марта 2006 года в 17<sup>00</sup> часов на заседании диссертационного совета К 501.001.08 в МГУ им. М.В. Ломоносова по адресу: 119992 ГСП, Москва, Воробьевы горы, МГУ им. М.В. Ломоносова, физический факультет, аудитория 5-19

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке физического факультета Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова

Автореферат разослан « 1 » ФЕВРАЛЯ 2006 года

Ученый секретарь  
Диссертационного совета К 501.001.08  
кандидат физико-математических наук



Г.Б. Хомутов

2006 А  
2399

## I. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

*Актуальность темы диссертации.* Фундаментальным свойством природной клетки является хиральная чистота ее основных молекулярных компонентов: белков-ферментов и нуклеиновых кислот. На атомно-молекулярном уровне организации природной клетки данное свойство проявляется в том, что ее нуклеиновые кислоты построены исключительно из D-изомеров сахаров, белки – из L-изомеров аминокислот. Данное свойство известно как нарушение зеркальной симметрии живой природы.

Аминокислоты и нуклеиновые кислоты содержат асимметричный атом углерода. Как известно, соединения с таким атомом образуют зеркальные изомеры (энантимеры), обладающие оптической активностью – способностью вращать плоскость поляризации света (L – влево, D – вправо). Например, все аминокислоты, за исключением глицина, содержат асимметричный  $\alpha$ -углеродный атом и, следовательно, возможны два оптических изомера каждой аминокислоты. Если молекула содержит N асимметричных атомов углерода, то существуют  $2^N$  ее оптических изомеров. Например, рибоза может содержать 4 асимметричных атома углерода и, следовательно, возможно существование 16 ее оптических изомеров. Существуют и другие биологически активные молекулы, содержащие центры асимметрии. По последним данным, не менее половины молекул живых организмов являются оптически активными.

Рассматривая общие структурные особенности природной клетки, целесообразно выделить два аспекта нарушения зеркальной симметрии живой природы. Первый аспект связан с гомохиральностью биополимеров, участвующих в матричном синтезе белков и нуклеиновых кислот. Второй аспект связан с тем, что белки-ферменты и нуклеиновые кислоты имеют разный знак хиральности: белки-ферменты построены исключительно из L-изомеров аминокислотных остатков, нуклеотиды ДНК и РНК построены исключительно из D-изомеров сахаров.

Следует отметить, что D-аминокислоты достаточно широко распространены в живой природе и, более того, входят в состав ряда биологически значимых коротких олигопептидов. Например, встречаются бактерии, которые содержат D-



глутаминовую кислоту и D-аланин в своих клеточных стенках, а в организме человека вырабатывается в качестве нейромедиатора D-серин.

Физико-химические и биологические основы гомохиральности биополимеров в последнее время изучены достаточно хорошо:

- 1) гомохиральность белков и нуклеиновых кислот определяет их стереоспецифичность – необходимое условие матричного синтеза;
- 2) гомохиральность белков и нуклеиновых кислот обуславливает стабильность их структур, обеспечивающих их функционирование;
- 3) для биохимических преобразований гомохиральных соединений требуется гораздо меньший набор ферментов, чем для таких же преобразований гетерохиральных соединений.

Напротив, физико-химические и биологические основы того, что белки-ферменты и нуклеиновые кислоты имеют определенный знак хиральности, остаются неизвестными.

Вышесказанное объясняет перспективность построения моделей зеркальных изомеров белков природной клетки, а исследование их структурно-функциональных особенностей позволит получить частичный ответ на вопрос об эволюционном выборе строго определенного знака хиральности аминокислотных остатков.

Очевидно, что при исследовании структуры и механизмов функционирования зеркальных антиподов белков, практически невозможно охватить всего их многообразия. Поэтому мы ограничились исследованием определенного класса белков. В качестве последних мы исследовали три трансмембранных канала: потенциал-независимый калиевый канал, потенциал-зависимый калиевый канал и аквапорин. Последний выбор не является случайным, а обусловлен тем, что хиральная асимметрия живой природы непосредственным образом связана с другой фундаментальной асимметрией – ионной асимметрией в содержании важнейших катионов во внутренней и внешней среде клеток. Связь эта опосредована через ион-транспортующие системы мембран, в частности, трансмембранные каналы.

**Цели и задачи работы.** Целью настоящего исследования являлось исследование структурно-функциональных особенностей зеркальных изомеров трех природных трансмембранных каналов.

Для достижения цели исследования решались следующие задачи:

- разработка эффективного метода расчета энергетических профилей ионов в трансмембранных каналах;
- объяснение, по полученным энергетическим профилям, механизмов ионной избирательности природных каналов;
- построение четвертичной структуры D-изомеров природных каналов;
- исследование ионной избирательности D-изомеров трансмембранных каналов.

#### **Объекты исследований.**

Потенциал-независимый калиевый канал  $K_{CSA}$ , потенциал-зависимый калиевый канал  $K_{VAP}$ , аквапорины  $AP_1$ .

Атомные координаты мембранных каналов брали из Банка белковых структур (*Protein Data Bank, Brookhaven National Laboratory, USA*).

**Научная новизна полученных результатов.** В результате исследований впервые:

1. Предложен расчетный метод, основанный на разделении ближних и дальних взаимодействий, позволяющий получать адекватные энергетические профили ионов в трансмембранных каналах.
2. По рассчитанным энергетическим профилям ионов, предложено объяснение механизмов ионной избирательности природных каналов.
3. Построены модели D-изомеров каналов с инвариантной природной аминокислотной последовательностью.
4. Установлено, что D-изомеры каналов являются энергетически менее стабильными, чем природные, а также для них характерно нарушение ионной избирательности, свойственной природным каналам.

**Практическое значение работы** заключается в том, что разработанные подходы позволяют количественно объяснить ионную избирательность

мембранных каналов. Учитывая, что огромное число заболеваний связано с «каналопатологиями» - нарушениями функционирования ионных каналов, полученные результаты и разработанные подходы могут быть использованы при разработке стратегии и средств лечения этих заболеваний. Полученные результаты могут быть использованы при исследовании биологического отклика организма от изомеризации каналов за счет глобальных внешних воздействий на биосферу и решения общих проблем ее хиральной безопасности.

Полученные результаты существенно расширяют представления о физических механизмах происхождения жизни, функционирования ионных каналов и могут быть использованы в курсах лекций по биофизике, биохимии и физиологии.

***Основные положения диссертации, выносимые на защиту.***

1. Расчетный метод, основанный на разделении ближних и дальних взаимодействий, позволяющий получать адекватные энергетические профили ионов в трансмембранных каналах.

2. Количественное объяснение по полученным энергетическим профилям механизмов ионной избирательности природных каналов.

3. Четвертичные структуры D-изомеров трансмембранных каналов с инвариантной природной аминокислотной последовательностью.

4. Утверждение о том, что D-изомеры каналов являются энергетически менее стабильными, чем природные, а также для них характерно нарушение ионной избирательности, свойственной природным каналам.

***Апробация результатов диссертации.*** Результаты исследований по теме диссертации представлены на: Международной школе-конференции «Введение в многомерный анализ данных (проекционные методы)» (Кострома, 2002), 13<sup>th</sup> International Congress on Molecular Biology (Toronto, 2002), 8-м Всероссийском симпозиуме «Биоинформатика и компьютерное конструирование лекарств» (Москва, 2002), 6-й Пушкинской школе-конференции молодых ученых «Биология – наука 21-го века» (Пушино, 2002), 3-й Всероссийской конференции «Молекулярное моделирование» (Москва, 2003), 4<sup>th</sup> Symposium on Multivariate Data Analysis (Moscow, 2003), 3-м Съезде биофизиков России (Воронеж, 2004), 4-й

Всероссийской конференции «Молекулярное моделирование» (Москва, 2005), Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2005» (Москва, 2005).

**Опубликованность результатов.** По материалам диссертации опубликовано 5 статей и 6 тезисов докладов.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация включает введение, основную часть, состоящую из 3 глав, заключение, включающее основные выводы и список литературы из 130 наименований.

## II. ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### Глава 1. Разделение дальних и ближних взаимодействий в расчетах энергетических профилей ионов

Движение иона в трансмембранном канале однозначно определяется профилем его потенциальной энергии. Действительно, потенциальная энергия, как функция координат иона в поре канала, входит во все уравнения, описывающие ионный транспорт в каналах: корпускулярно-механические (молекулярной и ланжевеновой динамики) и макроскопические (Пуассона-Нернста-Планка и теория переходного состояния Эйринга). В некоторых случаях, данные уравнения применяются для исследования проницаемости и анализа рядов селективности трансмембранных каналов.

Для расчета энергетического профиля иона в поре канала применяются две группы методов: силовых полей (молекулярной механики) и квантовой химии.

Расчетные методы квантовой химии, по сравнению с методами силового поля, дают более, а иногда единственно точные результаты. Единственным недостатком, ограничивающим применение квантовохимических расчетных методов, является относительно длительное время расчета для больших молекулярных систем.

## Молекулярно-механический расчет энергетического профиля.

Адекватность молекулярно-механических функций потенциальных энергий ионов исследуем для потенциал-независимого бактериального калиевого канала  $K_{CSA}$  (Рис. 1). Рассчитанные силовыми полями AMBER, CHARMM и OPLS, энергетические профили  $Li^+$ ,  $Na^+$  и  $K^+$ , для одноименных ионов, качественно совпадают друг с другом. Наблюдается лишь количественное расхождение

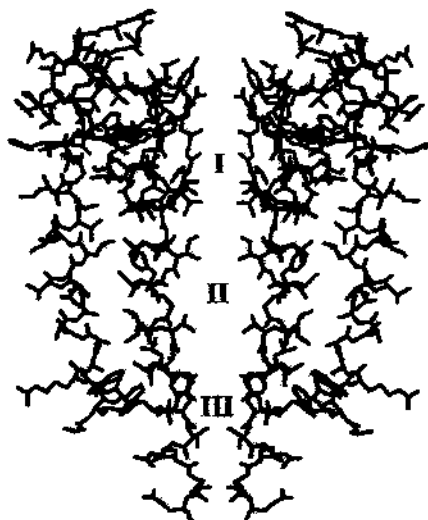


Рис. 1. Поперечный срез канала  $K_{CSA}$ , показывающий две из четырех его субъединиц

по абсолютной величине в следующей последовательности  $Li^+ > Na^+ > K^+$ . В нижней поре канала существуют потенциальные барьеры, причем их высоты для различных ионов находятся в следующей последовательности  $K^+ > Na^+ > Li^+$ .

Одним из условий того, что рассчитанные энергетические профили ионов канала правильные, является предсказание по ним калиевой избирательности исследуемого канала. Согласно основным положениям теории ионной селективности каналов Дж. Эйзенмана, проникновение иона через селективный фильтр канала возможно только в случае, когда энергии взаимодействия иона с каналом достаточно для его дегидратации. Формально, это условие равенства (или превышения) значения глубины потенциальной ямы, локализованной около входа канала, и энергии дегидратации иона. В таблице 1 представлены экспериментальные энергии дегидратации и глубины потенциальных ям ионов,

профилей. Поэтому более детально рассмотрим энергетические профили ионов, рассчитанные методом AMBER (Рис. 2). Представленные профили, практически совпадают в области центральной полости (II), входа и выхода канала. Существенное различие энергетических профилей катионов наблюдается только в области селективного фильтра (I) и нижней поры (III). Так в области селективного фильтра глубины потенциальных ям ионов находятся



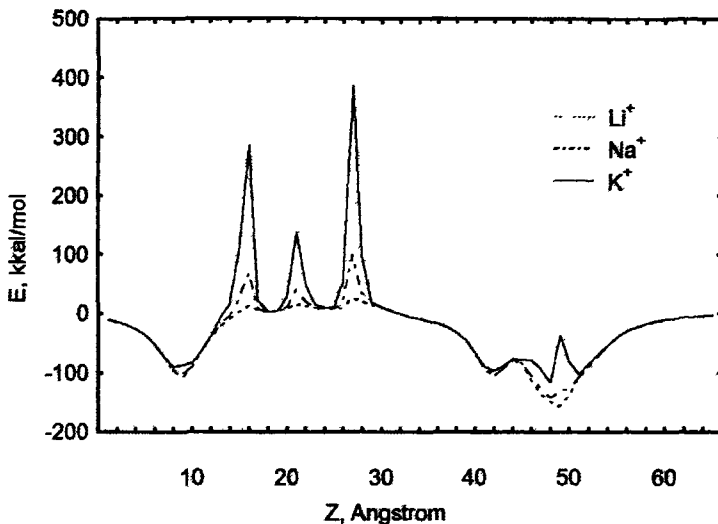


Рис. 2. Энергетические профили ионов в канале KcsA (расчет методом AMBER)

оцененные с учетом рассчитанного методом Буза значения эффективной константы диэлектрической проницаемости среды ( $\epsilon_e=2.5$ ).

Таблица 1

Энергии дегидратации и глубины потенциальных ям ионов в канале KcsA

Катион	Li <sup>+</sup>	Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>
Энергия дегидратации, ккал/моль	121	97	79
Глубина потенциальной ямы, ккал/моль	62	58	40

Таким образом, рассчитанные энергетические профили ионов предсказывают не только отсутствие калиевой избирательности, но и избирательности для других двух ионов канала KcsA. Данные результаты указывают на неадекватность рассчитанных методом AMBER энергетических профилей ионов.

Аналогичные результаты наблюдаются для профилей энергии катионов, рассчитанных методом силового поля CHARMM и OPLS.

Таким образом, целесообразно предложить метод расчета энергетического профиля иона, сохраняющий достоинства квантовохимического и молекулярно-механического методов.

*Разделение дальних и ближних взаимодействий в расчете энергетического профиля.* На больших расстояниях между ионом и атомами канала, когда нет существенного перекрыwania электронных оболочек, можно пренебречь эффектом взаимной поляризации взаимодействующих систем или деформацией электронных оболочек атомов молекулы в силовом поле иона, и наоборот. В таком случае, молекулу и ион можно рассматривать как изолированные друг от друга системы. В молекуле канала за счет внутримолекулярных индуктивных эффектов создается собственное распределение электронной плотности, эффективное рассмотрение которого приводит к появлению точечных зарядов на атомах. Это позволяет проводить расчеты энергии взаимодействия молекулы канала и иона по классической кулоновской схеме для данных зарядов. Энергия иона, в таком случае, с точностью до множителя будет совпадать с электростатическим потенциалом.

При сближении иона и молекулы канала их электронные оболочки перекрываются и для расчета энергии их взаимодействия необходимо учитывать эффект взаимной поляризации взаимодействующих систем. В этом случае, единственно правильный результат дает квантовохимический расчет энергии взаимодействия молекул, а не кулоновская схема для точечных зарядов на атомах.

В связи с этим, можно разделить результирующую энергию взаимодействия иона с атомными группами канала на две аддитивные составляющие:  $E_1$  – энергия при небольших расстояниях ион – атомы канала и  $E_2$  – энергия при больших расстояниях ион – атомы канала. Энергию  $E_1$  целесообразно рассчитывать одним из квантовохимических методов для системы ион – ближние аминокислоты, энергию  $E_2$  рассчитывать в приближении точечных зарядов на атомах дальних аминокислот по классической кулоновской схеме для точечных зарядов на атомах. Причем в качестве последних, можно использовать параметры электростатических взаимодействий одного из силовых полей или точечные заряды на атомах, рассчитанные квантовохимически.

Энергию  $E_1$  рассчитывали методом Хоффмана в параметризации Вольфсберга-Гельмгольца,  $E_2$  – методом силового поля AMBER, заряды на атомах аминокислот которого совпадают с зарядами, рассчитанными неэмпирическим квантовохимическим методом.

Для разделения ближних и дальних аминокислот в аксиально-симметричных каналах удобно ввести цилиндр обрезания – воображаемый цилиндр, ось которого совпадает с осью аксиальной симметрии канала и радиусом  $R_0$ . В таком случае центральным является вопрос о расстоянии между ионом и аминокислотами, где энергию взаимодействия молекул можно рассчитывать в приближении точечных зарядов на атомах и расстоянии, где необходим квантовохимический расчет. Очевидно, что данное расстояние и будет определять радиус цилиндра обрезания.

Применительно к расчету энергии взаимодействия иона и молекулы канала, целесообразно провести такой расчет в приближении точечных зарядов на атомах

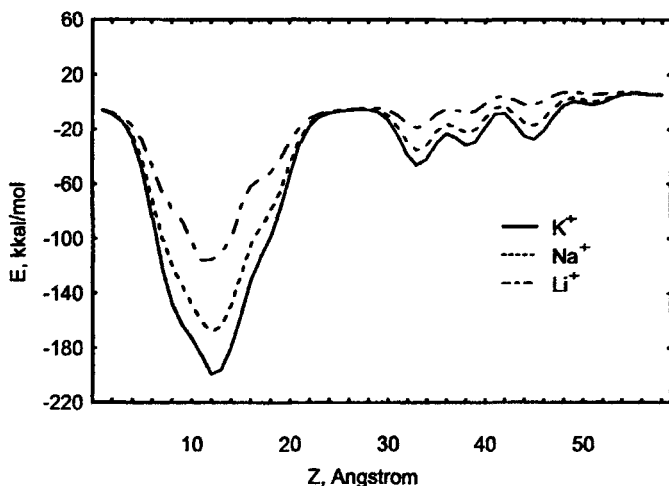


Рис. 3. Энергетические профили ионов в канале  $K_{csA}$  (расчет методом разделения дальних и ближних взаимодействий)

отдельных аминокислот, а также квантовохимически в системе ион – аминокислота. В этом случае в качестве  $R_0$  можно принять абсциссу точки расхождения рассчитанных зависимостей.

Для определения координат точки разделения двух функций нами проведены квантовохимические и классические кулоновские расчеты зависимости энергии взаимодействия от взаимного расстояния в системе ион – аминокислота. Подобные расчеты проведены для всех аминокислот, формирующих исследуемый канал, и 3 ионов. Наши расчеты показывают, что в зависимости от аминокислоты координаты

точки расхождения зависимостей составляют 3.2-4.2Å. Таким образом, величина  $R_0$  должна быть не меньше 4.2Å. Для упрощения расчетов нами принято  $R_0=5\text{Å}$ .

Результирующий энергетический профиль иона в канале  $E=E(Z)$  представляли в виде суммы  $E_1(Z)+E_2(Z)$ , где  $Z$  – координата оси аксиальной симметрии канала. Рассчитанные для ионов лития, натрия и калия функции  $E=E(Z)$  представлены на рисунке 3.

## **Глава 2. Механизмы ионной и водной избирательности природных трансмембранных каналов**

Современный подход к объяснению ионной селективности мембранных каналов основан главным образом на теории Дж. Эйзенмана. В теории Эйзенмана селективность каналов объясняется различием свободной энергии гидратации иона и энергии его взаимодействия с заряженными участками поры канала. Усовершенствованный подход к объяснению ионной селективности, предложенный А. Лайо, берет за основу основные положения теории Эйзенмана и статистической физики. В модели Лайо гамильтониан системы представлялся в виде суммы трех компонент: гидратационной энергии, обусловленной взаимодействием иона с молекулами воды; электростатической компоненты, обусловленной взаимодействием иона с заряженными и полярными группами поры канала; эластической компоненты, обусловленной деформацией формы канала. Для расчета энергии взаимодействия иона с каналом предложена формула

$$E_{\text{int}} = \frac{e^2 z_{\zeta}}{4\pi\epsilon(\rho)}, \quad (1)$$

где  $\epsilon(\rho)$  – значение микроскопической диэлектрической константы, как функции расстояния  $\rho$  от иона до заряженного участка канала,  $z_{\zeta}$  – эффективная валентность заряженных и полярных групп  $\zeta$ .

На наш взгляд, одним из недостатков, как теории Эйзенмана, так и теории Лайо является использование эффективных параметров в расчете энергии взаимодействия иона с заряженными и полярными группами канала. Прежде всего, это радиус иона и эффективная валентность. Так радиус иона является неоднозначным параметром и, в общем случае, зависит от структуры окружающих

его атомных групп. Эффективная валентность атома также зависит от состояния, в котором он находится: ковалентно связанном или свободном.

Другим более существенным недостатком теории Эйзенмана и теории Лайо является артефактность формулы (1) в расчетах потенциальной энергии иона, в случае, когда расстояние от иона до ближайшего к нему атома канала меньше  $4.2\text{\AA}$ . На таких расстояниях, в силу значимости квантовомеханических эффектов перекрывания электронных оболочек, приближение точечных атомных зарядов не применимо.

Таким образом, для расчета энергии взаимодействия иона с каналом необходимо привлечение метода, не использующего эффективные параметры и учитывающего в явном виде квантовомеханические эффекты перекрывания электронных оболочек иона и близлежащих атомов канала. На наш взгляд, это описанный в 1 главе метод, который основан на разделении дальних и ближних взаимодействий в системе ион – канал.

**Потенциал-независимый калиевый канал  $K_{CSA}$ .** Сравнительный анализ энергетических профилей (рис. 3) для различных ионов позволяет объяснить калиевую избирательность канала и, тем самым, ответить на вопрос об адекватности рассчитанных профилей. Минимум потенциальной энергии иона калия в области селективного фильтра равен  $-199\text{ ккал/моль}$ . С учетом  $\epsilon_e=2.5$  значение данного минимума равно  $-79\text{ ккал/моль}$ . Последнее значение соответствует (с противоположным знаком) экспериментальной энергии дегидратации данного иона. Тем самым энергии взаимодействия иона калия с каналом достаточно для компенсации энергии его дегидратации при входе в канал. Для ионов лития и натрия данное условие не выполняется, что отражено в таблице 2.

Таблица 2

Энергии дегидратации ионов и глубины потенциальных ям ионов в канале  $K_{CSA}$ , рассчитанные методом разделения дальних и ближних взаимодействий

Катион	$Li^+$	$Na^+$	$K^+$
Энергия дегидратации, ккал/моль	121	97	79
Глубина потенциальной ямы, ккал/моль	48	64	79

Данные результаты указывают на исключительно калиевую избирательность канала, что согласуется с экспериментальными данными и традиционным объяснением калиевой избирательности канала.

Таким образом, результаты расчета энергетических профилей ионов в поре канала являются адекватными экспериментальным данным. Соответствующие профили ионов предложенным методом рассчитаны для других исследуемых трансмембранных каналов.

*Потенциал-зависимый калиевый канал  $K_vAP$ .*

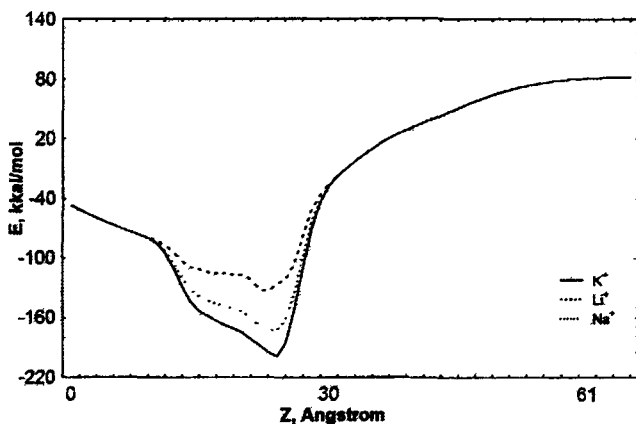


Рис. 4. Энергетические профили ионов в открытом канале  $K_vAP$

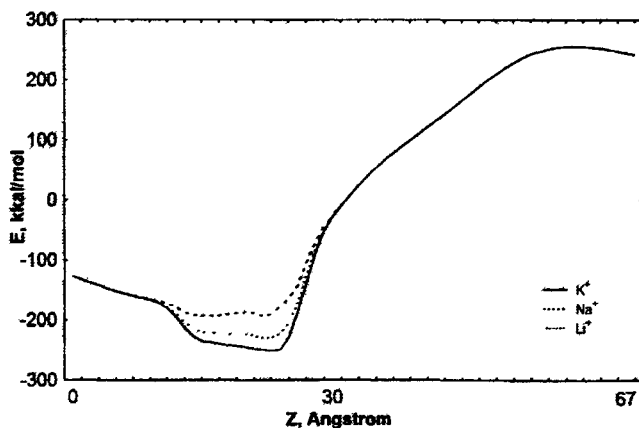


Рис. 5. Энергетические профили ионов в закрытом канале  $K_vAP$

Трансмембранный домен канала  $K_vAP$ , определяющий его калиевую избирательность, структурно гомологичен каналу  $K_{csA}$ . Характерной особенностью потенциал-зависимого канала является наличие четырех подвижных доменов – электрических сенсоров, ответственных за открывание и закрывание канала. Данный 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. При изменении направления трансмембранного потенциала достаточно лабильный сенсор канала занимает новое положение, что приводит к переходу канала из открытого состояния в закрытое состояние и наоборот.

Энергетические профили ионов для открытого и закрытого канала представлены на рисунках 4 и 5, соответственно. Различаются они в области селективного фильтра – наиболее узкой области поры канала. Наиболее глубокая потенциальная яма в области селективного фильтра и наиболее низкий потенциальный барьер в области нижней поры соответствуют иону калия, что может быть основой для объяснения ионной избирательности канала. Совпадение профилей наблюдается в области центральной полости – наиболее широкой области поры канала.

Сравнительный анализ энергетических профилей ионов открытого канала позволяет объяснить калиевую избирательность канала. Минимум потенциальной энергии иона калия в области селективного фильтра равен  $-199 \text{ ккал/моль}$ . С учетом  $\epsilon_r = 2.5$  значение данного минимума равно  $-79 \text{ ккал/моль}$ . Последнее значение соответствует (с противоположным знаком) экспериментальной энергии дегидратации данного иона. Тем самым энергии взаимодействия иона калия с каналом достаточно для компенсации энергии его дегидратации при входе в канал. Для ионов лития и натрия данные условия не выполняются, что отражено в таблице 3. Данные результаты указывают на исключительно калиевую избирательность канала, что согласуется с экспериментальными данными.

Таблица 3

Основные характеристики энергетических профилей ионов и полная энергия канала К<sub>v</sub>АР (ккал/моль)

Открытый канал		
<i>Потенциальные ямы</i>	K <sup>+</sup>	-200
	Na <sup>+</sup>	-173
	Li <sup>+</sup>	-134
<i>Потенциальный барьер</i>		82
<i>Полная энергия</i>		-8479
Закрытый канал		
<i>Потенциальные ямы</i>	K <sup>+</sup>	-251
	Na <sup>+</sup>	-229
	Li <sup>+</sup>	-194
<i>Потенциальный барьер</i>		258
<i>Полная энергия</i>		-8467
<i>Разность энергий</i>		12

Распределение энергии ионов в закрытом канале качественно аналогично распределению энергии для открытого канала. Закрытый канал также способен пропускать через селективный фильтр только ионы калия. Главное отличие наблюдается в величинах энергетических барьеров в области центральной полости канала. Если для открытого канала данное значение составляет 82 ккал/моль, то для закрытого канала – 257 ккал/моль. С учетом эффективной константы диэлектрической проницаемости среды, моделирующей область центральной поры и принимающей значение равное 82, энергетический барьер открытого канала составляет 1 ккал/моль, закрытого – 3 ккал/моль. Последнее значение определяет непроницаемый для ионов энергетический барьер и соответствует закрытому состоянию канала. Энергетический барьер в открытом канале проницаем за счет запаса энергии иона в трансмембранном потенциале, равном 1 ккал/моль.

Таким образом, изменение конформации открытого потенциал-зависимого калиевого канала под действием трансмембранного потенциала приводит к появлению непроницаемого для ионов энергетического барьера.



### Глава 3. Механизмы ионной и водной избирательности зеркальных изомеров природных трансмембранных каналов

Для построения D-изомеров каналов в природном канале проводили замену всех L-аминокислот на их зеркальные изомеры (D-аминокислоты). Предполагалось, что такая точечная изомеризация приведет к изменению структуры канала и, как следствие, приведет к вариации его функциональных свойств.

Стерические напряжения, обусловленные проведенной изомеризацией канала, снимали минимизацией функции потенциальной энергии модельного канала методом молекулярной механики. Нами использовалось силовое поле AMBER.

*D*-изомер потенциал-независимого калиевого канала  $K_{CSA}$ . Полная энергия оптимизированного канала D- $K_{CSA}$  составляет: -12376 ккал/моль. При этом

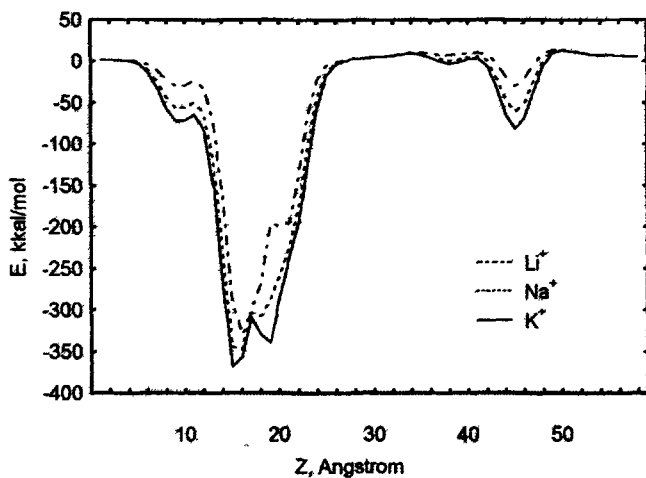


Рис. 6. Энергетические профили ионов в канале D- $K_{CSA}$

природный изомер канала на 11840 ккал/моль стабильнее, чем его D-изомер. Рассчитанные методом разделения дальних и ближних взаимодействий энергетические профили ионов в канале D- $K_{CSA}$  представлены на рисунке 6.

Данные распределения энергии ионов характеризуются наличием двух минимумов в области селективного фильтра: первая потенциальная яма иона  $K^+$  с учетом  $\epsilon_{eff}=2.5$  глубиной 144 ккал/моль. Аналогично природному калиевому каналу,

анализ ионных избирательностей модельных каналов удобно проводить с помощью данных таблицы 4.

Таблица 4

Энергии дегидратации и глубины потенциальных ям ионов в канале D-K<sub>CS</sub>A

Катион	Li <sup>+</sup>	Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>
Энергия дегидратации, ккал/моль	121	97	79
Глубина потенциальной ямы, ккал/моль	136	140	144

Глубины потенциальных ям всех ионов в канале D-K<sub>CS</sub>A превышают соответствующие значения энергии их дегидратации, поэтому данный канал способен пропускать все три иона, но с различной проводимостью. В этом отношении канал D-K<sub>CS</sub>A аналогичен грамицидиновому каналу. Катионная селективность, проявляемая грамицидиновым каналом в отношении одновалентных катионов, невелика, она соответствует всего пятикратному изменению коэффициентов проницаемости. Проницаемость канала для одновалентных катионов изменяется в следующем порядке: Cs<sup>+</sup>>Rb<sup>+</sup>>K<sup>+</sup>>Na<sup>+</sup>>Li<sup>+</sup>.

*D-изомер потенциал-зависимого калиевого канала K<sub>V</sub>AP.* Энергетические профили ионов для открытого (D-K<sub>V</sub>AP<sub>o</sub>) и закрытого (D-K<sub>V</sub>AP<sub>c</sub>) канала качественно эквивалентны соответствующим профилям природного канала K<sub>V</sub>AP (Рис. 4, 5). Профили различаются в области селективного фильтра. Наиболее глубокая потенциальная яма в области селективного фильтра и наиболее низкий потенциальный барьер в области нижней поры соответствуют иону калия. Совпадение профилей наблюдается в области центральной полости.

Сравнительный анализ профилей различных ионов канала D-K<sub>V</sub>AP<sub>o</sub> и D-K<sub>V</sub>AP<sub>c</sub> позволяет объяснить отсутствие калиевой избирательности каналов. Минимум потенциальной энергии иона калия в области селективного фильтра равен -85ккал/моль. С учетом ε<sub>c</sub>=2.5 значение данного минимума равно -35ккал/моль. Последнее значение значительно меньше, чем значение (с противоположным знаком) экспериментальной энергии дегидратации данного иона. Тем самым энергии взаимодействия иона калия с каналом не достаточно для компенсации энергии его дегидратации при входе в канал. Для ионов лития и

натрия данные условия не выполняются, что показано в таблице 5. Данные результаты указывают на отсутствие проницаемости для всех исследуемых ионов.

Таблица 5

Основные характеристики энергетических профилей ионов и полная энергия канала D-K<sub>v</sub>AP (ккал/моль)

Канал D-K <sub>v</sub> AP <sub>o</sub>		
<i>Потенциальные ямы</i>	K <sup>+</sup>	-85
	Na <sup>+</sup>	-66
	Li <sup>+</sup>	-38
<i>Потенциальный барьер</i>		6
<i>Полная энергия</i>		-5331
Канал D-K <sub>v</sub> AP <sub>c</sub>		
<i>Потенциальные ямы</i>	K <sup>+</sup>	-84
	Na <sup>+</sup>	-65
	Li <sup>+</sup>	-37
<i>Потенциальный барьер</i>		15
<i>Полная энергия</i>		-5244
<i>Разность энергий</i>		87

Существуют и другие данные, свидетельствующие о нарушении нормального механизма работы калиевого канала. Это разность энергий между открытой и закрытой конформациями канала, которая составляет значительную величину – 87ккал/моль.

Кроме того, природный изомер канала на 3148ккал/моль стабильнее, чем его D-изомер.

*D-изомер аквапорина AP<sub>1</sub>*. Структура D-изомера аквапорина (D-AP<sub>1</sub>) и для сравнения природного аквапорина представлена на рисунке 7. Наиболее узкая часть D-аквапорина имеет диаметр 1.4Å, что меньше размеров молекулы воды. Данный результат можно рассматривать как отсутствие водной проницаемости D-аквапорина. Таким образом, D-аквапорин не способен регулировать содержание воды внутри и снаружи клетки, что приводит к нарушению жизненно важных

свойств живых клеток с инкрустированными в них модельными D-аквапоринами. Например, в нервных клетках регуляция поступления воды влияет на состояние ионных каналов, передающих нервные импульсы.

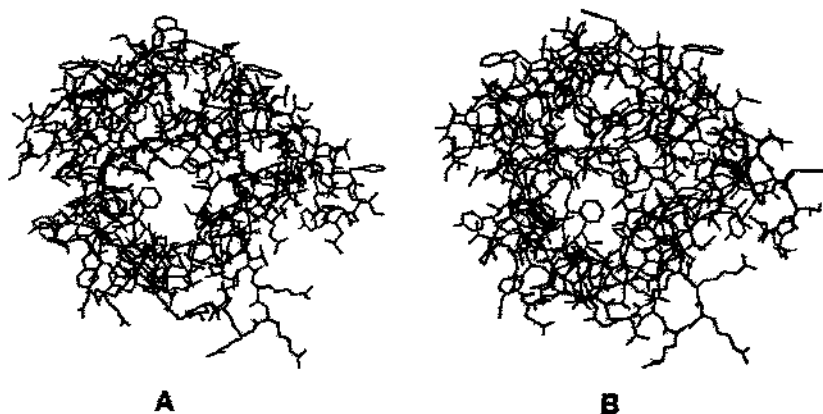


Рис. 7. Структура природного аквапорина (А) и аквапорина D-AP<sub>1</sub> (В)

Кроме этого, природный изомер аквапорина на 2258 ккал/моль стабильнее, чем его D-изомер.

## ВЫВОДЫ

1. Предложенный метод расчета энергетических профилей ионов в мембранных каналах, основанный на разделении и независимом расчете энергий дальних и ближних взаимодействий, в отличие от методов силовых полей, позволяет получать адекватные распределения энергии ионов. Используя данный метод можно проводить расчеты дальних взаимодействий одним из методов силового поля, специально параметризованным для моделирования структуры биополимеров; ближних взаимодействий – одним из квантовохимических методов, пригодным для исследования белков. В последнем случае, может быть использован метод Хоффмана в параметризации Вольфсберга-Гельмгольца. При этом разделение дальних и ближних взаимодействий возможно, если расстояние от иона до атомов канала составляет около  $5\text{\AA}$ , что подтверждается сравнением функций

энергии взаимодействия в системе ион – аминокислота, рассчитанных методом силового поля и методом квантовой химии.

2. Результаты сравнительного анализа рассчитанных энергетических профилей ионов в мембранных каналах позволили количественно объяснить их ионную избирательность. При этом проникновение иона в канал количественно объясняется равенством глубины потенциальной ямы и энергии дегидратации соответствующего иона. Для потенциал-зависимого калиевого канала ионная избирательность определяется не только гидратационным фактором, но и характером энергетических профилей ионов в открытом и закрытом канале.

3. Изомеризация природных мембранных каналов, с последующей их энергетической оптимизацией, приводит к существенному нарушению их природной четвертичной структуры. При этом в D-изомерах мембранных каналов нарушается свойство ионной избирательности, что, как следствие, приводит к нарушению биологических функций, обусловленных свойством их ионной избирательности. Вместе с тем, наблюдается меньшая энергетическая стабильность исследуемых неприродных изомеров каналов.

4. Для построения четвертичной структуры неприродных D-изомеров каналов, сохраняющих свойства ионной избирательности соответствующих природных каналов, необходима модификация первичной структуры соответствующих природных каналов.

## **СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

1. 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.

2. Дмитриев А.В., Барышников В.Г., Марков И.В., Твердислов В.А. Об использовании приближенных силовых полей для расчета распределения электростатического потенциала мембранных каналов // Журнал структурной химии. 2005. Т. 45. №5. С.624-628.

3. 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.122.

4. 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.

5. 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.

6. 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.

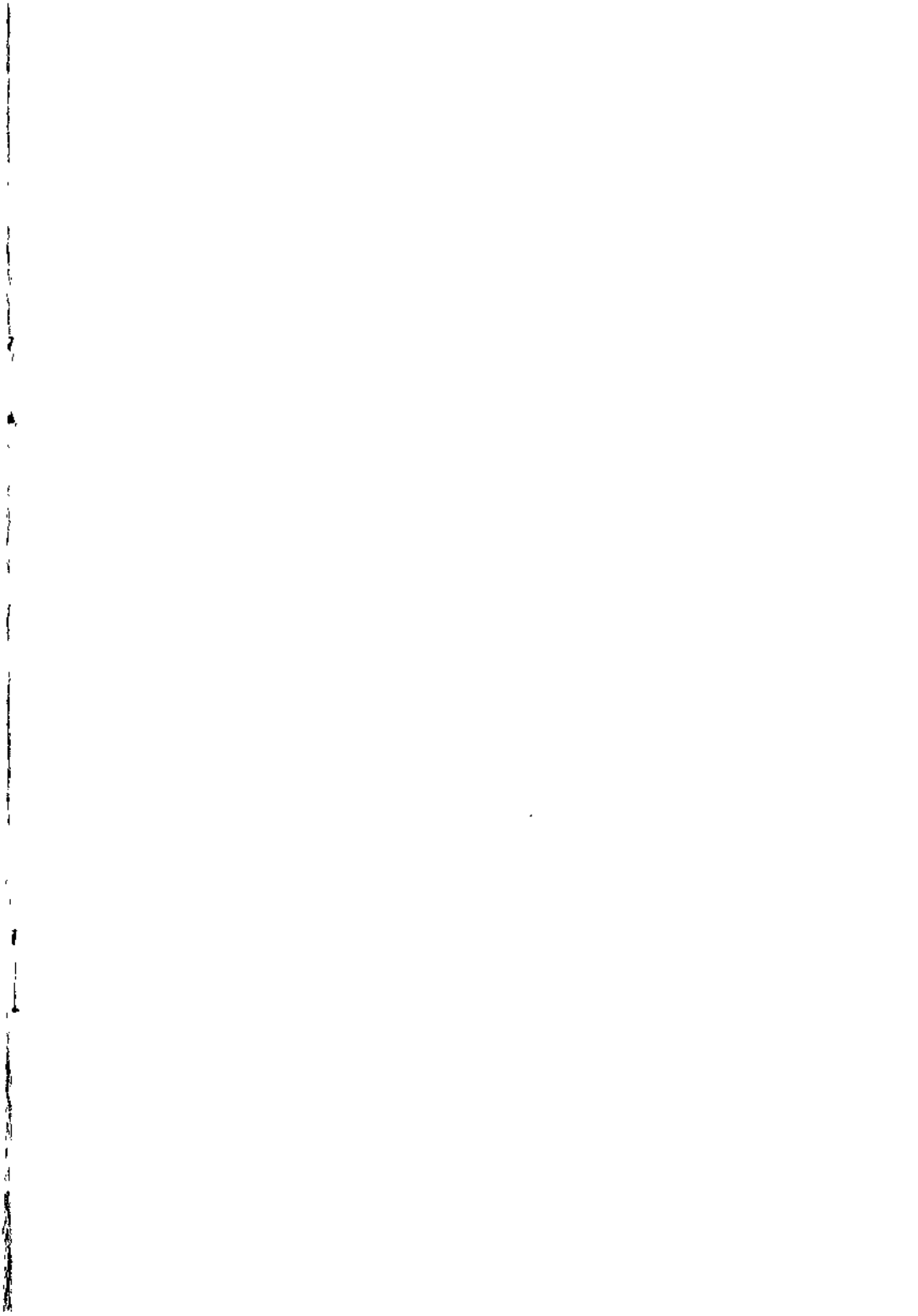
7. Дмитриев А.В., Марков И.В. Ионные каналы. Методы расчета распределения потенциала. Липецк, 2004. 32 с.

8. Дмитриев А.В., Марков И.В. Ионные каналы. Структура и механизмы функционирования. Липецк, 2004. 25 с.

9. Исаева Г.А., Исаев П.П., Дмитриев 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. Москва: Изд-во ИБМХ РАМН, 2002. С.218.

10. 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.

11. Марков И.В., Дмитриев А.В., Исаева Г.А., Николаевский В.А., Исаев П.П. Исследование латентных факторов в структурных и биологических данных производных фенилпропиофенона // Прикладные информационные аспекты медицины. 2001. Т.4. №3. С.48-52.



2006A  
2399

**# - 2399**