

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
им. М.В. ЛОМОНОСОВА  
Физический факультет

---

На правах рукописи

Жаворонков Александр Александрович

**ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ИОНОВ И ХИРАЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ  
В МОДЕЛЬНЫХ И БИОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕМАХ**

Специальности: 03.00.02 – биофизика, 03.00.16 – экология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата физико-математических наук

Москва – 2008

Работа выполнена на кафедре биофизики физического факультета  
Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова

Научный руководитель: доктор физико-математических наук, профессор  
Твердислов Всеволод Александрович

Официальные оппоненты: доктор физико-математических наук,  
старший научный сотрудник  
Нечипуренко Юрий Дмитриевич

кандидат биологических наук, доцент  
Асеев Виктор Васильевич

Ведущая организация: Институт биохимической физики  
им. Н.М. Эмануэля РАН

Защита диссертации состоится «22» мая 2008 года в 17-00 часов на заседании  
диссертационного совета Д 501.002.11 при Московском государственном  
университете им. М.В. Ломоносова по адресу: 119992, ГСП-2, Москва,  
Воробьевы горы, МГУ им. М.В.Ломоносова, д.1, стр.2, физический факультет,  
аудитория 5-19.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Физического факультета  
МГУ им. М.В.Ломоносова

Автореферат разослан « 21 » апреля 2008г.

Ученый секретарь

диссертационного совета Д 501.002.11

доктор физико-математических наук

Г.Б. Хомутов

## **Общая характеристика работы**

### **Актуальность темы исследования**

Живые клетки характеризуются двумя универсальными свойствами: неравновесными асимметричными распределениями ионов и энантиомеров важнейших хиральных биологических соединений между клеткой и внеклеточной средой. Внутренняя среда клетки содержит ионы калия в более высокой концентрации, чем ионы натрия, тогда как наружная среда – наоборот. Нуклеиновые кислоты содержат исключительно D-изомеры остатков сахаров (дезоксирибозы и рибозы), пептидные цепи белков построены из L-изомеров аминокислот, а биологические мембраны включают в себя только L-фосфолипиды. В неживой природе хиральные соединения представлены, как правило, энантиомерами в равных концентрациях. Указанную асимметрию распределений ионов и энантиомеров хиральных веществ в биосфере принято называть ионной и хиральной асимметрией.

В цикле работ, выполненных на кафедре биофизики физического факультета МГУ, экспериментально обоснована гипотеза о возникновении асимметричных распределений ионов натрия и калия, магния и кальция, а также энантиомеров аминокислот и углеводов между термодинамически неравновесным тонким поверхностным слоем (ТПС) и объемной фазой морской воды. Такие асимметричные распределения частиц между различными областями (компартаментами) системы вызваны фракционированием соответствующих ионов и молекул. Авторами упомянутых работ установлено, что ионы и энантиомеры хиральных веществ могут перераспределяться между ТПС и объемной фазой независимо друг от друга. Вместе с тем, имеется ряд свидетельств в пользу того, что ионная и хиральная специфичности в клетках функционально связаны. Так, например, в тех же работах теоретически показано, что ионная специфичность мембранных каналов однозначно связана с гомохиральностью аминокислотных остатков их полипептидных цепей. В настоящее время известно, что при старении организма изменения ионного

гомеостаза происходят параллельно с накоплением абберантных белков, содержащих D-изомеры аминокислотных остатков, и изменением уровня свободных D-аминокислот в клетках. Однако надежно не установлены какие-либо взаимозависимости между этими процессами.

Аминокислоты могут образовывать координационные соединения с ионами металлов ( $\text{Cr}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{UO}^{2+}$  и др.), которые при этом приобретают свойства катализаторов, например, полимеризации нуклеотидов и синтеза и реакций с восстановлением двойных связей  $\text{C}=\text{O}$  и  $\text{C}=\text{N}$  у различных малых молекул. Из литературных данных следует, что в таких реакциях существенно нарушаются соотношения концентраций гомо- и гетерополимеров, L- и D-изомеров хиральных веществ, характерные для равновесных систем. Это свидетельствует в пользу того, что в открытых системах физико-химические процессы способны дискриминировать энантиомеры хиральных соединений. Поскольку энантиомеры по всем физико-химическим свойствам, кроме оптической активности, неразличимы, в указанных системах, по-видимому, существуют неучтенные факторы, приводящие к их хиральной селективности. До сих пор эти факторы не выявлены, поэтому необходимо накопление и обобщение экспериментальных данных о процессах, приводящих к хиральной поляризации (появлению избытка одного из энантиомеров по сравнению с другим) среды.

Роли ионов переходных металлов в биологии посвящено огромное количество научных работ. Однако лишь недавно появились гипотезы и данные о их возможной непосредственной роли в регуляции важнейших клеточных процессов, таких, например, как взаимодействие белков с нуклеиновыми кислотами и регуляция экспрессии генов. По гипотезе Г.Б. Хомутова, ионы железа могут непосредственно модулировать взаимодействие ДНК с такими белками, как хроматин. При этом важнейшую роль в процессе регуляции играет изменение редокс-состояния иона. В последние годы появились данные о том, что при изменении валентности иона может изменяться и хиральность его

комплекса с органическими лигандами. В то же время, появились данные, что у некоторых факторов транскрипции, представляющих собой железо-серные белки, при связывании с ДНК сильно изменяется окислительно-восстановительный потенциал. Таким образом, изменения валентностей ионов и их концентраций может непосредственно влиять на процессы с участием хиральных соединений и взаимодействия белков с нуклеиновыми кислотами. Эти вопросы рассмотрены в настоящей работе на основании литературных данных.

Проблемы молекулярной асимметрии непосредственно связаны с процессами в современной биосфере. Некоторые вещества, не свойственные природным экосистемам, могут накапливаться в их различных частях и влиять на их устойчивость. Так, например, для антропогенных загрязнений экосистем антиподами естественных стереоизомеров хиральных веществ механизмы биологической деградации обычно отсутствуют, что может приводить к их накоплению и переносу на значительные расстояния. До сих пор не изучена проблема потребления D-аминокислот с пищей, в которой они образуются как при рацемизации при ее приготовлении, так и естественным путем или же при потреблении пищевых добавок. Это – новые проблемы, без эффективного решения которых возможны экологические кризисы с непредсказуемыми последствиями.

### **Цель работы**

Целью настоящей работы было выявление и изучение физико-химических факторов, обуславливающих сопряженное возникновение ионной и хиральной асимметрий в природных и модельных системах, а также их функциональное взаимодействие в живых системах.

### **Задачи работы**

1. Изучение эффектов фракционирования ионов и энантиомеров хиральных соединений на неравновесных границах раствор-воздух.

2. Исследование физико-химических эффектов взаимодействия ионов и энантиомеров фосфолипидов в ленгмюровских плёнках.

3. Исследование зависимости флотации хиральных соединений от ионного состава среды.

4. Теоретическое исследование эффектов рацемизации аминокислотных остатков на функциональные характеристики ионных каналов.

5. Исследование и анализ эффектов рацемизации аминокислотных остатков в белках при старении.

6. Анализ материалов относительно возможной роли ионов переходных металлов в трансформации хиральных соединений в биосфере.

### **Научная новизна работы**

В настоящей работе впервые в едином рассмотрении выполнено теоретическое и экспериментальное исследование физико-химических факторов, обусловивших сопряженное возникновение фундаментальных асимметрий в живых системах – хиральной (аминокислоты, углеводы, липиды) и ионной.

Экспериментально установлена непосредственная зависимость между фракционированием энантиомеров аминокислот и ионным составом среды при флотации с неионным детергентом.

При изучении ленгмюровских монослоев экспериментально показано, что у различных стереоизомеров фосфолипидов зависимости физико-химических свойств от ионного состава различаются.

В численных экспериментах продемонстрировано значительное изменение структуры и ионной специфичности мембранных каналов при замене L-аминокислотных остатков на D-энантиомеры.

С помощью анализа первичной структуры белков, выявлены определенные закономерности спонтанной рацемизации при старении. Предложена гипотеза о возможной роли спонтанной рацемизации в свободнорадикальном механизме старения.

На основании собственных и литературных данных развиты представления о синергизме ионного, хирального и других видов загрязнений окружающей среды в концепции экологической безопасности.

### **Практическая ценность работы**

Разработанные экспериментальные подходы и методики могут быть использованы для анализа фракционирования веществ в природных условиях при определении характеристик распространения антропогенных загрязнений. Результаты работы могут найти практическое применение в следующих областях:

- при разработке новых методов диагностики поверхности океана;
- при разработке методов разделения смесей веществ;
- при разработке новых методов очистки окружающей среды от антропогенных загрязнений;
- при разработке норм экологической безопасности с учетом перераспределения антропогенных хиральных загрязнений биосферы;
- при изучении механизмов воздействия различных физико-химических факторов на биологические системы, а также в молекулярной геронтологии;
- как материалы в курсах лекций по биофизике, биохимии, молекулярной биологии, фармакологии, экологии для студентов соответствующих специальностей.

### **Основные положения, выносимые на защиту**

1. В биологических и в модельных неравновесных нелинейных физико-химических системах асимметричные распределения ионов и энантиомеров хиральных соединений взаимосвязаны.
2. При возрастных изменениях и некоторых патологических состояниях организма происходят коррелированные изменения ионного и хирального гомеостаза.

## **Апробация работы и публикации**

Результаты работы были доложены на Научной конференции «Ломоносов- 2008», МГУ им. М.В.Ломоносова, физический факультет, секция биофизики (Москва, 2008).

По теме диссертации опубликовано 5 печатных работ, из них в рецензируемых журналах по списку ВАК – 2, статьи в других журналах, изданиях и тематических сборниках – 1, в материалах конференций – 2.

## **Структура и объем работы**

Диссертационная работа состоит из введения, четырех глав, заключения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 111 страницах, содержит 35 рисунков и 9 таблиц, список литературы включает 116 библиографических ссылок.

## **Основное содержание работы**

Во введении сформулирована цель и задачи исследования, показана научная новизна и практическая значимость полученных результатов. перечислены защищаемые положения.

В первой главе представлен обзор работ, посвященных проблемам возникновения асимметричных распределений катионов и энантиомеров хиральных веществ между клетками и внеклеточной средой в ходе предбиологической эволюции, фракционирования ионов в ТПС, структуре воды, в частности, вблизи границ разделов фаз, роли гомохиральности ионных каналов, а также основным представлениям о механизмах старения.

Первоначальные этапы добиологической эволюции, видимо, были связаны с физическими и физико-химическими основами абиогенной самоорганизации. Физические принципы имеют в данном случае более общий характер, нежели их конкретное химическое воплощение. В настоящей работе на основании известных экспериментов и гипотез, а также собственных исследований, рассмотрены некоторые важнейшие физические аспекты возникновения предшественников живых клеток. В частности, показано, что



процессы, происходящие на неравновесных границах разделов фаз, могли обеспечить необходимые условия для возникновения предшественников клеток, способных к дарвиновской эволюции.

Неравновесные процессы на границе раздела фаз раствор-воздух играют ключевую роль в тепло- и массообмене между океаном и атмосферой. Экспериментально установлено, что на поверхности океана обычно формируется поверхностный микрослой, характеризующийся пониженной температурой и повышенной соленостью воды. При этом соотношение концентраций ионов в поверхностном слое значительно отличается от соотношения концентраций ионов в объемной фазе: ТПС относительно обогащен ионами калия и кальция.

Коэффициент фракционирования ионов калия по отношению к ионам натрия в ТПС выражается следующим образом:

$$\alpha_f = \frac{[K]_s [Na]_b}{[Na]_s [K]_b},$$

где  $[K]_s$ ,  $[Na]_s$  – молярные концентрации ионов калия и натрия в ТПС,  $[K]_b$ ,  $[Na]_b$  – молярные концентрации ионов калия и натрия в объемной фазе раствора. Значения  $\alpha_f$  в естественных условиях могут достигать примерно 10.

Неравновесные процессы, сопровождающиеся перераспределением ионов, могут приводить к генерации токов в ТПС, т.е. процессы переноса ионов в ТПС могут быть электрогенными. Экспериментально подтверждено, что в ТПС существует разность потенциалов в несколько милливольт, зависящая от ионного состава раствора (Караваева и др.).

Существующие модели фракционирования ионов в ТПС не позволяют получить экспериментально наблюдаемые коэффициенты фракционирования. По-видимому, необходим учет вкладов многих дополнительных факторов, таких как зависимость растворимости солей от температуры, электрофорез, поверхностная адсорбция и т.п. Изменение свойств самой воды вблизи поверхности и в зависимости от ионного состава раствора может играть

существенную роль в перераспределении ионов в ТПС (Pollack, 2001; Аксенов, 2004; Kimmel, 2005).

Неравновесный поверхностный слой водного раствора обладает еще одним удивительным свойством, экспериментально обнаруженным в лабораторных условиях: аэрозольные капли, полученные из растворов рацемических смесей аминокислот, были обогащены L-энантиомером соответствующей аминокислоты по сравнению с ее D-энантиомером (Кузнецова и др, 1992). Преобладание одного из энантиомеров в смеси характеризуют коэффициентом хиральной асимметрии (поляризации)  $\eta = \frac{[L]-[D]}{[L]+[D]}$  (в квадратных скобках – концентрации соответствующих энантиомеров). В экспериментах с растворами валина, лейцина и глутамина были получены значения  $\eta$  в диапазоне от 0 до 0,05, причем фракционирование энантиомеров зависело от степени неравновесности поверхностного слоя и исчезало в равновесных условиях. Ошибки измерений в этих экспериментах были значительными, поэтому необходимо было разработать новые экспериментальные методики для измерений хиральной поляризации ТПС.

Фактором отбора энантиомеров в поверхностном слое может быть влияние собственного электрического поля тонкого поверхностного слоя в совокупности с геомагнитным полем Земли, термокапиллярной и термогравитационной конвекцией на формирование ассоциатов молекул аминокислот, особенно в присутствии ионов переходных металлов. Обнаруженное фракционирование энантиомеров невелико, но его вполне достаточно для реализации стартового эволюционного преимущества гомохиральности определенного типа при образовании полипептидов и полинуклеотидов.

В клетках хиральная асимметрия непосредственным образом связана с ионной асимметрией. Данная связь реализуется в белковых (полипептидных) ион-транспортующих системах, в частности, в ионных каналах и ионных

насосах мембран. Детали структур молекулярных комплексов ионных насосов плазматических мембран пока не установлены. Ионные каналы обладают уникальной пространственной конфигурацией, обеспечивающей избирательную проницаемость для ионов, и в то же время для многих из них имеются полные структурные данные, что делает их удобными моделями для исследования связи структуры и их функций.

В последнем разделе главы рассмотрены основные положения различных теорий старения. Практически все чрезвычайно разноплановые подходы к трактовке механизмов старения и на генетическом уровне, и на уровне клеточного метаболизма, транспортных, иммунных процессов и т.д. могут иметь прямое отношение к процессам возрастной или патологической рацемизации в биомолекулах. Поскольку на клеточный биосинтез с участием прохиральных и хиральных молекул, как и на процессы их деградации, могут влиять ионы металлов, в частности, металлов с переменной валентностью, важно выяснить возможные механизмы взаимодействия ионов и хиральных соединений в этих процессах.

Во второй главе диссертации приведены литературные данные и результаты собственных исследований зависимости характеристик физико-химических процессов с участием энантиомеров хиральных соединений от параметров среды, в частности от ее ионного состава.

В первом разделе приведены результаты экспериментальных исследований изотерм сжатия монослоев фосфолипидов при различных соотношениях концентраций их энантиомеров и различных ионных составах водной субфазы.

Из литературных данных известно, что в ряде случаев наблюдаются различия в изотермах монослоев чистых энантиомеров и их рацемических смесей, как правило, при переходе монослоя из газовой фазы в жидкую через промежуточное метастабильное состояние. Из фазовых диаграмм ленгмюровских монослоев фосфолипидов следует, что спонтанное разделение

фаз в смеси энантимеров происходит только при сильных электростатических взаимодействиях между головами молекул фосфолипидов. Были получены также непосредственные экспериментальные данные о разделении фаз в монослое фосфолипида (миристоилаланина) после его сжатия до жидкого состояния. Насколько известно автору, влияние катионов металлов на физико-химические свойства монослоев фосфолипидов с различной хиральной поляризацией до сих пор не исследовано.

В работе были использованы 1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфохолин и 1,2-дипальмитоил-gac-глицеро-3-фосфохолин (молекулярная формула  $C_{40}H_{80}NO_8P$ , молекулярный вес 734.1) производства “Sigma”, чистота 99%; 1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин и 1,2-дипальмитоил-gac-глицеро-3-фосфоэтаноламин (молекулярная формула  $C_{37}H_{74}NO_8P$ , молекулярный вес 692.0) производства “Sigma”, чистота 99%; KCl и NaCl производства «Диаэм» категории ОСЧ; особо чистая вода, деионизированная системой очистки воды фирмы “Millipore” (pH 6,3, поверхностное натяжение 72,88 мН/м при 21°C); хлороформ стабилизированный ( $CHCl_3$ ) производства «Химмед» категории «хч». В экспериментах были использованы растворы L-фосфатидилхолина и LD-фосфатидилхолина в хлороформе концентрацией 1мМ, приготовленные при комнатной температуре в качестве субфазы использовали водные растворы солей NaCl и KCl с концентрациями 0,01 М, 0,1 М и 1,0 М.

Для исследования монослоев была использована установка, состоящая из тefлоновой ванны Ленгмюра с размером  $200 \times 140 \times 5$ (мм), датчика поверхностного давления – весов Вильгельми, неподвижного и сжимающего барьеров. Управление установкой осуществлялось через персональный компьютер с помощью специальной программы.

Для получения монослоя на чистую поверхность водной фазы наносили раствор исследуемого вещества в хлороформе. Объем наносимого на поверхность раствора составлял 70 мкл. Через 10 мин, необходимых для

испарения растворителя, монослой поджимался с помощью подвижного барьера со скоростью  $7,2 \text{ \AA}^2/\text{мин}\cdot\text{молекула}$ . В ходе сжатия монослоя происходила запись  $\pi$ -A-изотермы (при температуре  $21 \text{ }^\circ\text{C}$ ).

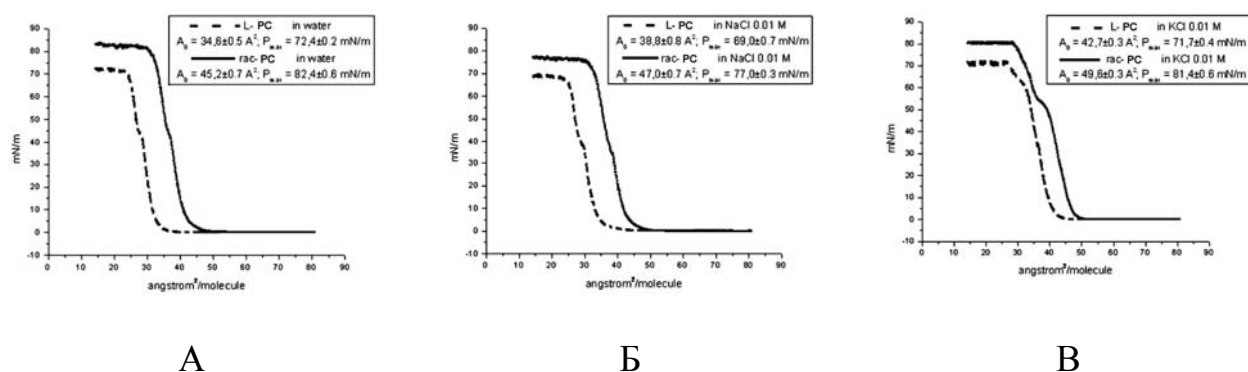


Рис. 1. Изотермы сжатия монослоя фосфатидилхолина на поверхности чистой воды (А) и 0,01 М растворов NaCl (Б) и KCl (В).

На рис. 1 приведены типичные записи изотерм сжатия монослоев, полученных из рацемата и L-изомера фосфатидилхолина, при использовании в качестве субфазы чистой воды и разбавленных растворов NaCl и KCl. Даже в малых концентрациях катионы натрия и калия оказывают различное влияние на основные параметры изотерм. В концентрированных растворах солей различия сохраняются (рис. 2).

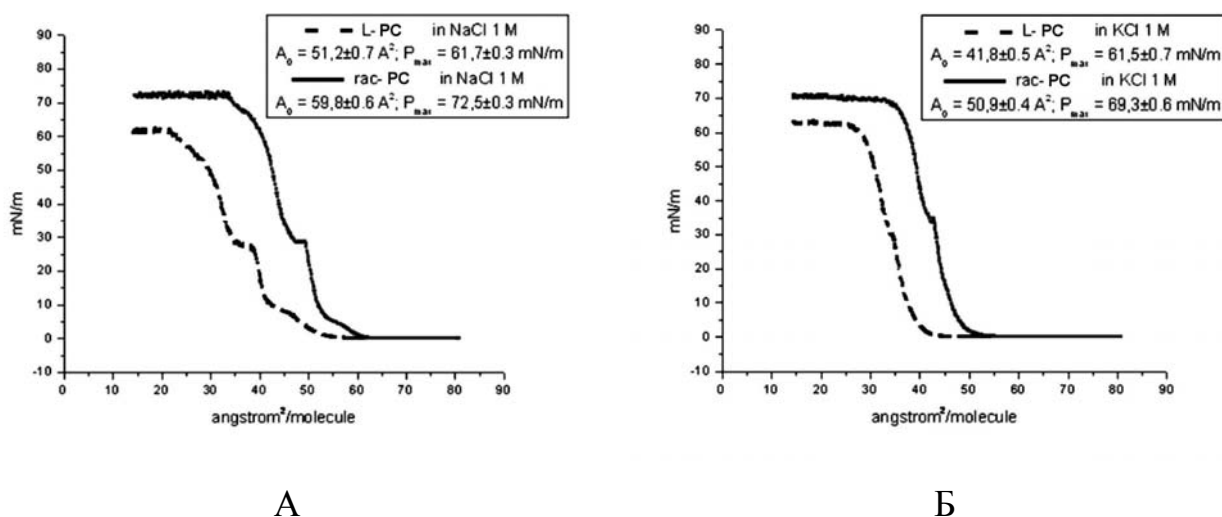


Рис. 2. Изотермы сжатия монослоев рацемата и L-фосфатидилхолина на поверхности 1,0 М растворов NaCl (А) и KCl (Б).

Сходные результаты получены и на монослоях рацемата и L-кефалина. В отличие от лецитина изотермы различных форм кефалина демонстрируют не

столько изменение плотности упаковки, сколько изменение структуры монослоя. Присутствие в водной субфазе NaCl приводит к сглаживанию различий в фазовом состоянии монослоев. Добавление KCl в водную фазу вызывает расширение монослоев, незначительному понижению давления монослоя рацемата. При этом особенности изотерм, полученных на чистой водной фазе, в целом сохраняются. Увеличение концентрации KCl до 0,1 М приводит к исчезновению фазового перехода на изотерме рацемата. Дальнейшее повышение концентрации KCl до 1 М приводит к большему разбросу значений давления и площади, чем в случае с NaCl, и к практически полному исчезновению различий между монослоями рацемата и L-кефалина на фоне их низкой стабильности.

Второй раздел содержит результаты экспериментальных исследований влияния ионов натрия и калия на характеристики флотации энантиомеров лейцина в присутствии неионного детергента Triton X-100.

При наличии в растворе поверхностно-активного вещества (ПАВ), его молекулы адсорбируются на поверхности раствора, образуя монослой. При барботировании образуется пена, захватывающая ТПС. Поскольку монослой ПАВ на поверхности раствора не плотный, скорость испарения воды в его присутствии изменяется незначительно, можно было ожидать, что в пенах также будет происходить фракционирование ионов и стереоизомеров аминокислот. Помимо захвата раствора из ТПС, барботаж может приводить к избирательной флотации растворенных веществ.

Эксперименты проведены с использованием лейцина производства ICN (США), KCl и NaCl производства «Реахим» категории «хч». Рацемические растворы L,D-лейцина с концентрацией 9 г/л готовили на растворах NaCl и KCl с концентрацией 0,15 М. В работе использовали дистиллированную воду. В качестве ПАВ использовали Triton X-100 производства фирмы Sigma в концентрации 7 мкл/мл.

Разность концентраций энантиомеров лейцина в пене определяли поляриметрически с помощью поляриметра Р-1000 фирмы Kjuess (Германия). Угол вращения плоскости поляризации пропорционален разности концентраций L и D изомеров:  $\alpha = [\alpha]_{\lambda}^T l(L - D)$ , где  $L$  и  $D$  – концентрации соответствующих стереоизомеров, где  $[\alpha]_{\lambda}^T$  – удельное вращение раствора при температуре  $T$  и длине волны поляризованного света  $\lambda$ ,  $l$  – длина кюветы (10 см). Было проведено 4 серии опытов в присутствии ионов натрия и 4 серии опытов в присутствии ионов калия. В условиях, близких к равновесным (при разности температур между объемной фазой и воздухом до 1 °С), перераспределения ионов и энантиомеров аминокислоты между объемной фазой и поверхностным слоем не обнаружено.

При разности температур 8°С хиральная поляризация была максимальной и составила  $0,14 \pm 0,04$  в присутствии ионов калия и  $0,07 \pm 0,01$  в присутствии ионов натрия. Результаты экспериментов приведены на рис. 3.

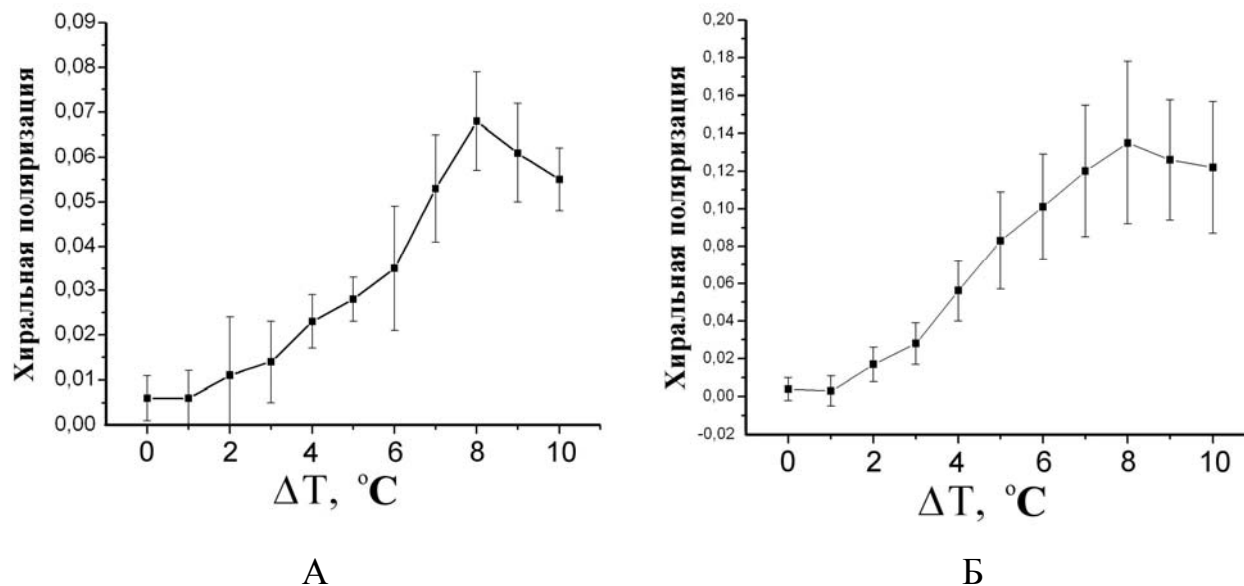


Рис. 3. Зависимость хиральной поляризации раствора, полученного пены, в зависимости от ионного состава при концентрации солей 1 М: А – NaCl, Б – KCl.

В общем случае энтропия смешения  $N_1$  молекул первого вида и  $N_2$  молекул второго составляет  $\delta S = N \left( N_1 \ln \frac{N_1 + N_2}{N_1} + N_2 \ln \frac{N_1 + N_2}{N_2} \right)$ .

В ТПС концентрация L-изомеров превышает концентрацию D-изомеров на величину (L-D), следовательно, число избыточных L-молекул в слое:  $N_1 = h \cdot s \cdot N_A \cdot (L - D) / M$ , где  $h=2$  мкм – толщина исследованного слоя ТПС,  $s = 1\text{ м}^2$ ,  $M$  – молярная масса аминокислоты ( $M_{\text{лейцина}} = 131$ ),  $N_A$  – число Авагадро. Из условия рацемичности исходного раствора следует, что  $N_1 = N_2$ . Следовательно, перераспределение энантиомеров в ТПС раствора означает уменьшение энтропии на величину:  $\delta S = 2h \cdot s \cdot N_A \cdot (L - D) \cdot \ln 2 / M$ .

Наблюдаемым значениям  $\eta$  соответствует уменьшение энтропии квадратного метра поверхностного слоя на величину порядка  $10^{-5}$  Дж/К. При постоянных температуре и давлении изменение свободной энергии системы при указанном перераспределении молекул энантиомеров равно  $\Delta G = T\delta S$ . Поскольку характерные времена микроконвективных движений в поверхностном слое воды, которые могут разрушать образовавшуюся структуру, имеют порядок 1 с, такое упорядочение требует затрат энергии около  $10^{-2}$  Вт/м<sup>2</sup>. Отметим, что масштаб энергетических потоков в системе океан-атмосфера существенно превышает эту величину (средний суммарный поток тепла из океана в атмосферу 220 Вт/м<sup>2</sup>).

В следующем разделе главы приведены результаты экспериментального исследования скорости рацемизации энантиомеров аланина и зависимость ее от ионного состава среды. 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, а через 20 мин она достигала стационарного значения 230 °С. Изменение хиральной поляризации определяли



в пробах, отбираемых из холодной камеры, стандартным методом с помощью ВЭЖХ с хиральными носителями. Полученные результаты приведены на рис. 4.

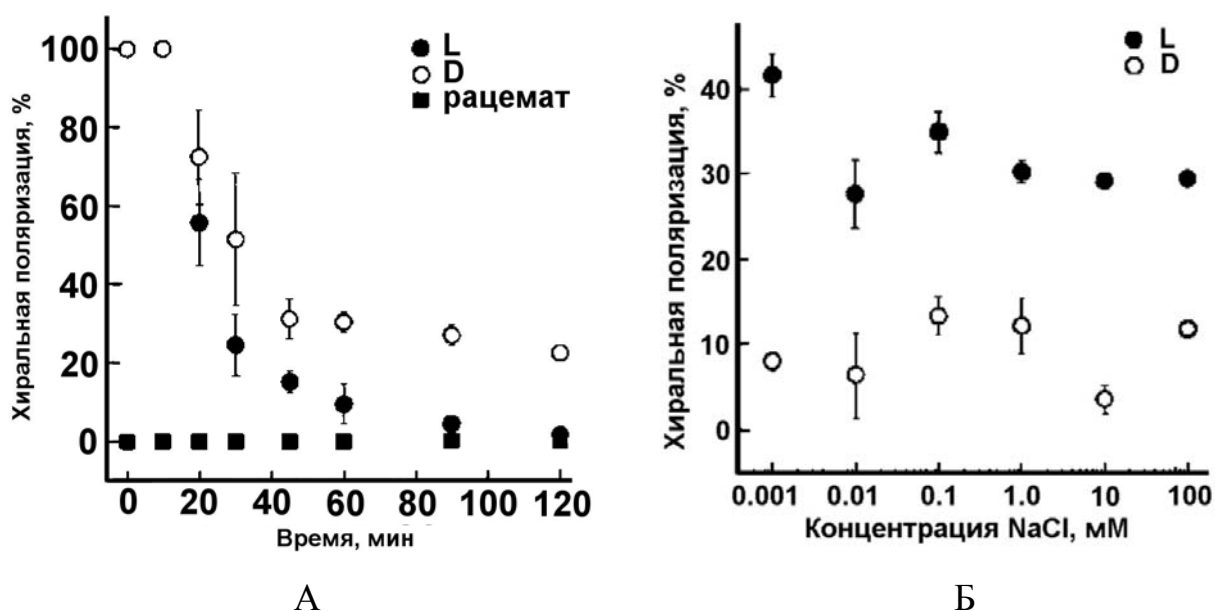


Рис. 4. Зависимость хиральной поляризации раствора L- и D-лейцина от времени в чистой воде (А) и от концентрации NaCl при фиксированном времени реакции 2 ч. (Б). Экспериментальные условия приведены в тексте.

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. В диапазоне значений рН 4–8 скорость рацемизации энантиомеров в пределах точности измерений от рН не зависела.

Третья глава посвящена функциональной взаимосвязи между асимметричными распределениями ионов и энантиомеров хиральных соединений между клеткой и средой. В первом разделе проведен анализ литературных данных об изменениях ионного и хирального гомеостаза клетки в процессе старения. Старение и патологические состояния сопровождаются изменениями как метаболизма, так и ионного гомеостаза клетки. Эти изменения могут быть, хотя бы частично, связаны с накоплением дефектов в генетическом аппарате клетки, а также ошибок в системе рециркуляции белков, приводящим к накоплению в клетке абберантных белков, которые часто бывают токсичными.

В составе белков наиболее нестабилен по отношению к рацемизации остаток аспарагина (Hirrkiss, 2001). При его спонтанном деаминировании образуются четыре продукта: L- и D-изомеры аспартата и изоаспартата. Остаток L-аспарагиновой кислоты также нестабилен и изомеризуется с образованием D-изомеров аспартата и изоаспартата, а также L-изоаспартата (Fujii, 1994). При окислительном стрессе неустойчивость аспарагина еще более возрастает (Ingrosso, 2000). В настоящей работе рассмотрены, в основном, данные, относящиеся к последствиям изомеризации аспарагина и аспартата.

Анализ имеющихся данных позволяет прийти к заключению, что дефектные белки, появляющихся в результате рацемизации аминокислотных остатков, могут приводить к ухудшению качества работы системы генетического контроля и появлению других аберрантных белков. Некоторые аберрантные белки обладают токсическими свойствами, например, могут ингибировать протеосомальный путь деградации белков. В результате продолжительность жизни белков в клетке возрастает, что приводит к увеличению вероятности спонтанной рацемизации аминокислотных остатков в их полипептидных цепях. Существенно, что многие ферменты, например, каспазы (непосредственные участники апоптоза), гликозилазы (ликвидаторы последствий окислительного стресса), имеют в активном центре остатки аспарагина, изомеризация которого приводит к потере активности фермента.

Существуют данные о том, что даже следы ионов металлов, попадающие в реакционную смесь из стекла, могут приводить к заметному ускорению рацемизации аспартата в растворе (van den Oetelaar, 1986). 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

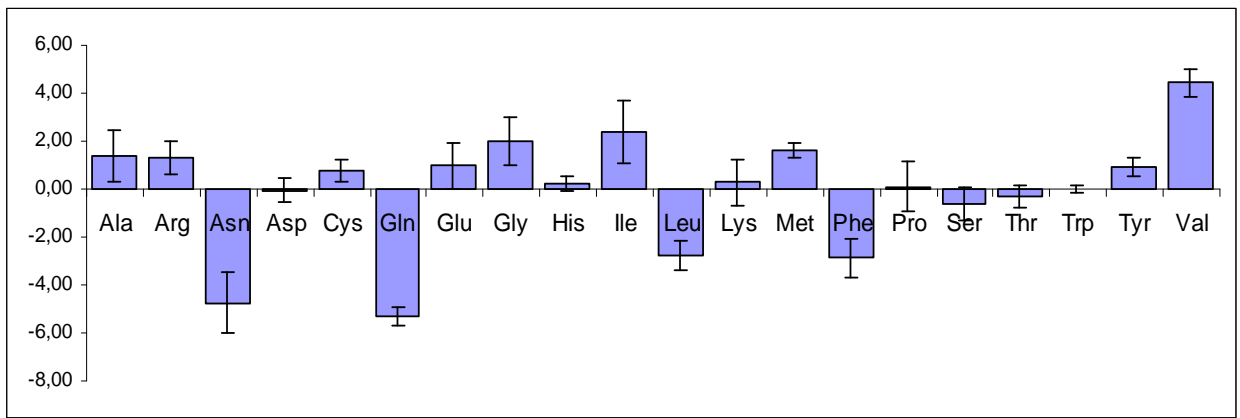
формированию катализаторов, ускоряющих рацемизацию аминокислот. Это имеет непосредственное отношение к проблемам загрязнения окружающей среды ионами тяжелых металлов.

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

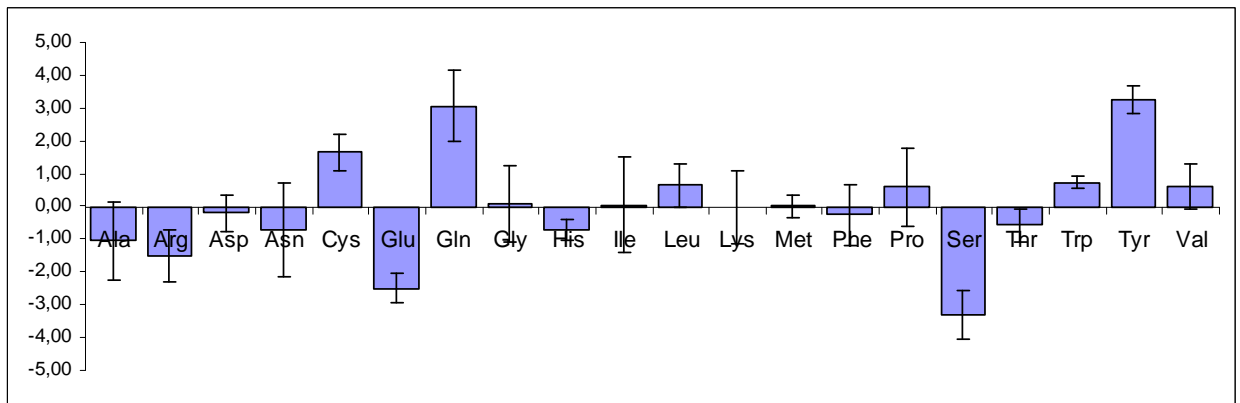
Во втором разделе третьей главы проведен анализ данных, имеющихся в литературе, с целью выявления зависимости скорости рацемизации аспартата в составе белков от их первичной, вторичной и третичной структуры, а также в синтетических полипептидах. Был проведен статистический анализ первичной и вторичной структуры 41 белка.

Были рассчитаны 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) (рис. 5), а также в аминокислотных последовательностях белков с учетом и без учета положения Asx во вторичной структуре белка.

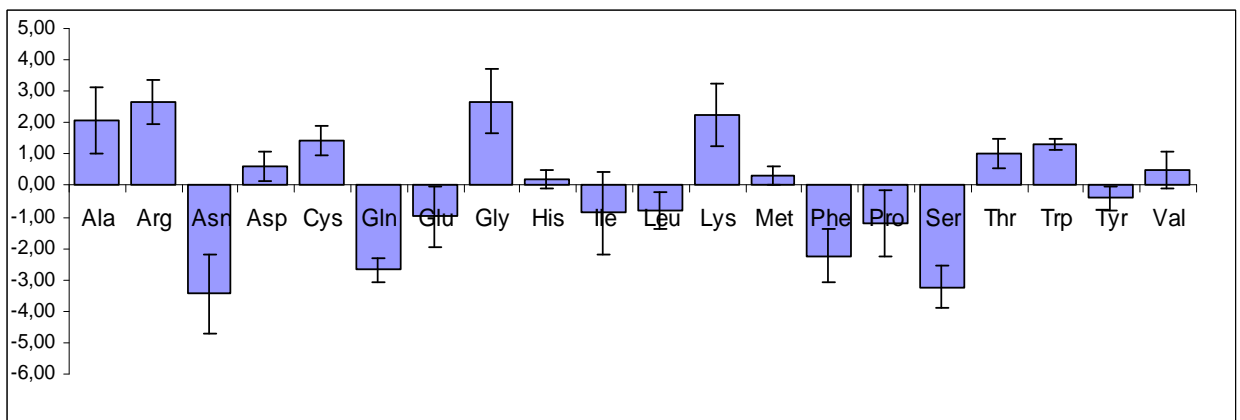
Согласно литературным данным, глицин в следующей за Asx позиции приводит к максимальной скорости рацемизации. Немного увеличиваются частоты встречаемости и других аминокислот (гистидин, аланин), при соседстве с которыми скорость рацемизации Asx наибольшая, однако, результаты не однозначны. Так, увеличиваются частоты встречаемости валина и глютаминовой кислоты, 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. Отметим, что выборка подверженных рацемизации белков невелика, и пока нельзя говорить о наличии или отсутствии корреляции между эффектом ускорения рацемизации Asx под влиянием соседних аминокислотных остатков



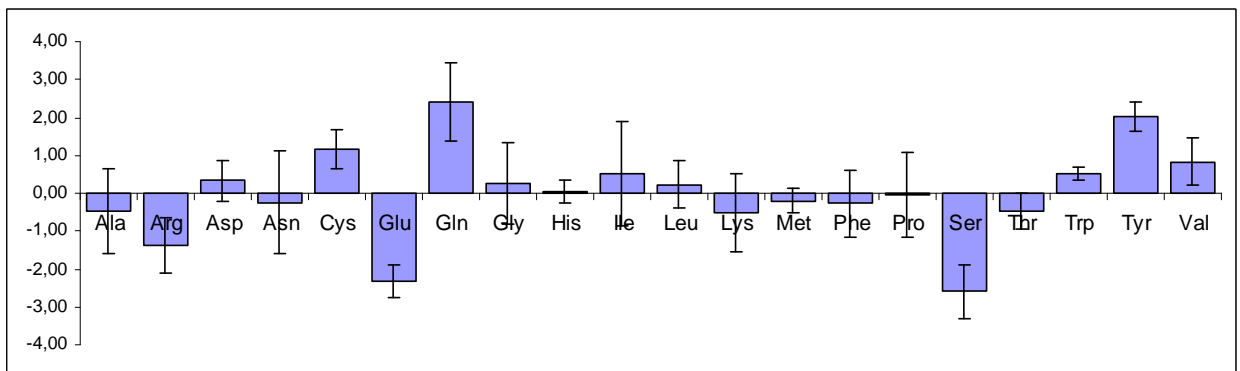
A



Б



В



Г

Рис. 5. Гистограммы разности между частотой встречаемости аминокислот в соседних с

аспарагином позициях в первичной структуре белков, в которых наблюдается рацемизация (А, В), во всех исследованных белках (Б, Г) и средней частотой встречаемости аминокислот для трипептидов X-D-X (А, Б), пентапептидов X-X-D-X-X (В, Г).

и частотой их встречаемости. В то же время, частоты встречаемости аминокислот в соседних с Asx позициях зависят от положения Asx во вторичной структуре. Анализ показывает, что наиболее подвержены рацемизации остатки Asx, находящиеся на открытых участках, изгибах, петлях, а располагающиеся в  $\alpha$ -спиралях и  $\beta$ -листах рацемизируются в меньшей степени.

В белках, в которых наблюдается рацемизация, выделяются участки, где остатки глутаминовой и аспарагиновой кислот пространственно сближены, и, таким образом, возникает локальный отрицательный заряд. Возможно, что локальное электростатическое поле способствует переходу L-Asp $\rightarrow$ D-Asp. Кроме того, отрицательные заряды могут служить центрами связывания катионов, которые, в свою очередь, могут катализировать образование сукцинимида и, таким образом, весь процесс рацемизации. После расширения выборки белков, подверженных рацемизации, и уточнения полученных нами данных их можно будет использовать для прогнозирования скорости рацемизации аспарагина и аспартата в различных белках и для диагностики возрастных патологий на ранних стадиях их развития.

Третий раздел третьей главы посвящен компьютерному исследованию роли стереоизомеризации аминокислот в нарушении функций каналов плазматических мембран: калиевого канала KcsA и водного канала аквапорина. В работе использован 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 этот подход позволяет получать адекватные профили потенциальной энергии ионов в каналах. Расчеты дальних взаимодействий проводятся одним из методов силового поля, специально параметризованным для моделирования структуры биополимеров, а ближних взаимодействий – квантовохимическим

методом Хоффмана в параметризации Вольфсберга-Гельмгольца. При этом разделение дальних и ближних взаимодействий было возможно, если расстояние от иона до атомов канала составляло около 5 Å.

Таблица 1. Энергии дегидратации ( $\Delta H_h$ ) и глубины потенциальных ям ( $\Delta E_i$ ) ионов в каналах L-KcsA и LD-KcsA

Канал	L-KcsA			LD-KcsA		
	Li <sup>+</sup>	Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	Li <sup>+</sup>	Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>
$\Delta H_h$ , ккал/моль	121	97	79	121	97	79
$\Delta E_i$ , ккал/моль	48	64	79	24	44	56

Результаты сравнительного анализа рассчитанных энергетических профилей ионов в природных гомохиральных (L-KcsA) и виртуальных гетерохиральных (LD-KcsA) каналах позволили количественно объяснить и сравнить их ионную избирательность. При этом проникновение иона в канал количественно объясняется равенством глубины потенциальной ямы и энергии дегидратации соответствующего иона. Результаты расчетов приведены в таблице 1.

Аквапорин, обеспечивающий проникновение воды в клетку, состоит из четырех субъединиц, каждая из которых имеет индивидуальную водную пору. Самая узкая часть поры имеет диаметр 2,8 Å, что примерно соответствует размерам молекулы воды. Координаты атомов аквапорина были взяты из Банка белковых структур (Protein Data Bank, Brookhaven National Laboratory, USA).

Для определения влияния изомеризации аспарагина и аспартата на функциональные характеристики канала была построена модельная молекула аквапорина, в которой указанные аминокислотные остатки были заменены на их D-изомеры. После снятия стерического напряжения в модельной молекуле путем минимизации ее потенциальной энергии в силовом поле AMBER была получена стабильная конформация канала (рис. 6). Расчет показал, что наиболее узкая часть модельного аквапорина имеет диаметр 2,4 Å. На таком расстоянии не наблюдается перекрывание вандерваальсовых радиусов атомов молекулы

воды и поры аквапорина (молекула воды не выталкивается обратно из поры канала). Подобные результаты, полученные при полной рацемизации аквапорина, известны из литературы (Дмитриев, 2006). Таким образом, рацемизация остатков аспарагина и аспартата в аквапорине, привела бы к нарушению водного обмена клетки, что характерно для процесса старения.

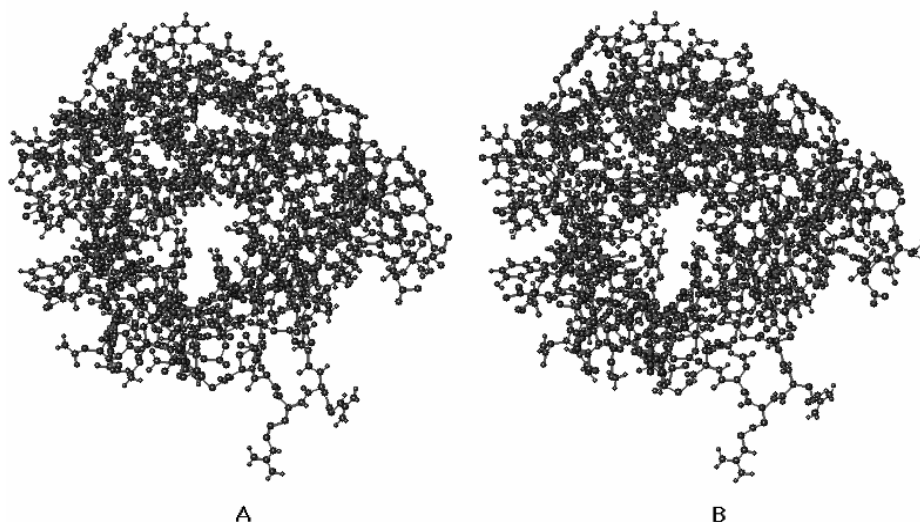


Рис. 6. Субъединица трансмембранного канала аквапорина: А – нативный белок, В – модельный белок, рассчитанный при замене всех L-аспарагиновых аминокислот на их D-изомеры.

Последняя, четвертая, глава диссертации посвящена обсуждению двух важных проблем, тесно связанных с тематикой настоящей работы. Первая проблема состоит в том, что ионы переходных металлов могут существенно влиять на кинетику реакций с участием хиральных соединений, причем это влияние изменяется при изменении валентности иона и различно для разных стереоизомеров одного и того же соединения. Комплексы аминокислот с многовалентными ионами обладают каталитическими свойствами по отношению к реакциям с восстановлением двойных связей  $C=O$  и  $C=N$ . Если в реакции участвует прохиральный реагент, хиральность продукта зависит от хиральности катализатора, но не однозначно: при изменении температуры с тем же катализатором можно получить продукт противоположной хиральности. Это открывает возможность параметрического разделения энантиомеров.

Ионы переменной валентности могут участвовать в переключении хиральности среды и при постоянной температуре. При изменении окислительно-восстановительного (редокс) состояния иона металла, образующего координационное соединение с органическими лигандами, в определенных случаях может происходить изменение конформации лигандов и оптической активности соединения. Это явление послужило основой для запатентованного в США электронного хирального переключателя. Нам представляется, что единичный акт переключения можно значительно усилить, поместив переключатель в хиральную жидкокристаллическую среду, в которой он может вызвать фазовый переход при изменении своего состояния.

Ионы переходных металлов сами по себе или в комплексе с органическими соединениями часто являются катализаторами образования перекисных соединений. Полученные в настоящей работе данные и результаты анализа литературных данных могут стать основой для построения общей модели взаимодействия ионов и хиральных соединений в биологических системах.

В последнем разделе четвертой главы кратко рассмотрены некоторые проблемы экологической безопасности, связанные с резко увеличившимся в последнее время потоком хиральных соединений антропогенного происхождения в биосферу. Затронуты вопросы деградации не участвующих в метаболизме энантиомеров, последствиях действия таких соединений в малых и сверхмалых дозах при длительной экспозиции. Фракционирование энантиомеров хиральных веществ и ионов тяжелых металлов в ТПС океана вследствие теплообмена между океаном и атмосферой приводит к глобальному перераспределению антропогенных загрязнений. Отсутствие мониторинга этих загрязнений может привести к неконтролируемым изменениям в биосфере – новому экологическому кризису.



## Основные результаты и выводы

1. В неравновесном тонком поверхностном слое (ТПС) раствора наблюдается сопряженное фракционирование ионов и энантиомеров хиральных веществ – аминокислот и углеводов. Коэффициент фракционирования ионов калия по отношению к ионам натрия в ТПС достигает величины  $\alpha_f \sim 10$ , хиральная поляризация ТПС, оцененная по флотации энантиомеров лейцина с неионным детергентом Triton X-100, при разности температур между воздухом и объемной фазой 8–9 °С составляет  $\eta = 0,07$  в присутствии ионов натрия и  $\eta = 0,14$  в присутствии ионов калия. В равновесных условиях указанные эффекты не наблюдаются.

2. Механические и термодинамические характеристики рацемических и гомохиральных фосфолипидных монослоев различны и зависят от ионного состава водной субфазы. При увеличении концентрации солей NaCl и KCl до 1,0 М влияние хиральности на свойства монослоев лецитина и кефалина уменьшается, при этом в присутствии KCl, в отличие от NaCl, различия в свойствах монослоев рацемата и L-изомера кефалина исчезают полностью.

3. Скорости рацемизации L- и D-энантиомеров аланина в проточном реакторе при разности температур 230 °С и давлении около 220 атм не совпадают и зависят от ионного состава среды. В воде степень прохождения реакции рацемизации L- и D-аланина за 2 ч составила 100% и 80%, а при концентрации NaCl более  $10^{-6}$  М – около 70% и 90%, соответственно. Скорость рацемизации аспартата в белках зависит от окружения, определяемого всеми уровнями структурной организации полипептидной цепи.

4. Проведено моделирование полной и частичной замены аминокислотных остатков их энантиомерами в первичной структуре ионного канала KcsA и водного канала аквапорина. В модели аквапорина минимальный диаметр поры уменьшается с 0,28 нм до 0,24 нм, в модели канала KcsA энергия связывания иона калия уменьшается с 79 ккал/моль, соответствующей энергии

дегидратации, до 56 ккал/моль, что приводит к утрате или существенному ухудшению функциональных характеристик каналов.

5. Показано, что ионы переходных металлов могут являться важным синергетическим фактором хиральной безопасности биосферы.

**Результаты диссертационной работы изложены в следующих публикациях**

1. Твердислов В.А., Яковенко Л.В., Жаворонков А.А. Хиральность как проблема биохимической физики.//Рос. хим. журнал (Журнал Рос. хим. об-ва им. Д.И. Менделеева), т. LI, №1, 2007. – С. 13–23.
2. Твердислов В.А., Жаворонков А.А., Яковенко Л.В. Хиральная чистота биосферы и экологическая безопасность.//Экология урбанизированных территорий, №1, 2007. – С. 6–11.
3. Твердислов В.А., Яковенко Л.В., Дмитриев А.В., Жаворонков А.А., Твердислова И.Л. Происхождение предшественников живой клетки. О двух фундаментальных асимметриях – ионной и хиральной.//В сб.: Проблемы регуляции в биологических системах. Биофизические аспекты./Под ред. А.Б. Рубина. – М.–Ижевск: НИЦ «Регулярная и хаотическая динамика», Институт компьютерных исследований, 2007. – 480 с.
4. Поволоцкая И.С., Жаворонков А.А., Твердислов В.А. Локальная структура полипептидных цепей и рацемизация аспартата в белках.//В сб. материалов конференции «Ломоносов-2008», секция «Физика», Физический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова – М., 2008. – С. 36–37.
5. Малык А.П., Жаворонков А.А., Юрова Т.В. Влияние одновалентных катионов на физико-химические свойства хиральных систем пониженной размерности.//В сб. материалов конференции «Ломоносов-2008», секция «Физика», Физический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова – М., 2008. – С. 37–38.