

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации  
Федеральное государственное автономное образовательное  
учреждение высшего образования  
«КАЗАНСКИЙ (ПРИВОЛЖСКИЙ) ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

ИНСТИТУТ ФИЗИКИ

Кафедра медицинской физики

Направление: 03.04.02 Физика

Профиль: Медицинская физика

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

ИССЛЕДОВАНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ КОМПЛЕКСА СЫВОРОТОЧНОГО  
АЛЬБУМИНА ЧЕЛОВЕКА С НУКЛЕОЗИДАМИ МЕТОДАМИ ЯМР  
СПЕКТРОСКОПИИ И КОМПЬЮТЕРНОГО ДОКИНГА

Студент 2 курса группы 06-919

«15» июня 2021 г.

(Бердиев Р.Ш.)

Научный руководитель

с.н.с., к.ф.-м.н.

«15» июня 2021 г.

(Хайрутдинов Б.И.)

Научный консультант

с.н.с., к.х.н.

«15» июня 2021 г.

(Ермакова Е.А.)

Заведующий кафедрой медицинская физика

д.х.н., профессор

«15» июня 2021 г.

(Аганов А.Г.)

Казань-2021

## СОДЕРЖАНИЕ

<b>1 Теоретическая часть</b>	<b>7</b>
<b>1.1 Ядерный магнитный резонанс</b>	<b>7</b>
<b>1.2 Основные параметры спектров ЯМР высокого разрешения</b>	<b>11</b>
<b>1.2.1 Химический сдвиг</b>	<b>11</b>
<b>1.3 Ядерный эффект Оверхаузера</b>	<b>15</b>
<b>1.4 Метод WaterLOGSY</b>	<b>21</b>
<b>1.5 Импульсная последовательность метода WaterLOGSY</b>	<b>22</b>
<b>1.5.1 Определение константы диссоциации методом WaterLOGSY Спектроскопии.</b>	<b>23</b>
<b>1.6 Молекулярный докинг</b>	<b>24</b>
<b>1.6.1 Программный пакет AutoDock</b>	<b>27</b>
<b>2 Объекты исследования</b>	<b>33</b>
<b>2.1 Белок</b>	<b>33</b>
<b>2.1.1 Белок сывороточный альбумин человека</b>	<b>37</b>
<b>2.2 Нуклеозиды</b>	<b>40</b>
<b>2.2.1 Лиганд</b>	<b>47</b>
<b>3 Экспериментальная часть</b>	<b>53</b>
<b>3.1 Регистрация ЯМР спектроскопии</b>	<b>53</b>
<b>3.2 Результаты молекулярного докинга</b>	<b>68</b>
<b>3.2.1 Взаимодействие нуклеозидов с сывороточным альбумином человека</b>	<b>70</b>
<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ</b>	<b>77</b>
<b>Научная деятельность</b>	<b>79</b>
<b>Благодарность</b>	<b>80</b>
<b>СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ</b>	<b>81</b>

## ВВЕДЕНИЕ

Ядерный магнитный резонанс (ЯМР) спектроскопия расширяет свои возможности с каждым годом по изучению структуры и свойств различных соединений. Сегодняшние способности спектроскопии ядерного магнитного резонанса дают возможность исследовать взаимодействие с макромолекулами, включая белки и фрагменты дезоксирибонуклеиновой кислоты и рибонуклеиновой кислоты. В протяжении последних нескольких лет скрининг ядерного магнитного резонанса получил особое место в целевых программах для создания лекарств.

Актуальной научной задачей молекулярное распознавание является важнейшим направлением проведения исследований современной науки. Белок-лигандное взаимодействие представляет интерес для прикладных аспектов разработки лекарственных препаратов в медицине (фармацевтики). Одним из наиболее информативных экспериментальных методов поиска молекулярных фрагментов, связывающихся с биомишенями, является спектроскопия ЯМР. Методов ЯМР можно разделить на две категории. В первой, наблюдение происходит за белком, записываются ЯМР спектры белка, определяют специфические аминокислотные остатки ответственные за взаимодействие с лигандом, и строится трехмерная модель комплекса. Во второй категории экспериментов ЯМР наблюдение происходит за сигналами лиганда, и по изменению физических параметров ЯМР сигналов лиганда, таких как химического сдвига, времен релаксаций, Ядерного Эффекта Оверхаузера (ЯЭО) судят об образовании белок-лигандного комплекса. В данную категорию попадает метод Water-Ligand Observed via Gradient Spectroscopy (WaterLOGSY). Преимущество первого подхода, когда происходит наблюдение за ЯМР сигналами белка, является возможность построения модели комплекса белка с лигандом на основании прямых экспериментальных данных. Недостатком же такого подхода является существенная дороговизна эксперимента требующего достаточно больших

количеств изотопно обогащённого белка, с одной стороны и ограничение на молекулярную массу белка, с другой стороны. Методы ЯМР спектроскопии, построенные на наблюдении за сигналами лиганда лишены этих недостатков. Можно использовать существенно меньшие количества белка, нет необходимости в его изотопном обогащении, и нет ограничения по молекулярной массе белка, с которым можно проводить эксперимент. Недостатком такого подхода является то, что эти эксперименты не дают прямой экспериментальной информации о структуре комплекса. Можно сделать оценку энергии образования комплекса, посредством измерения константы диссоциации.

Для компенсации недостатков методов ЯМР основанных на наблюдении сигналов лиганда в качестве дополнительного метода, возможно, применять компьютерное моделирование для построения модели комплекса лиганда с белком. Одним из наиболее быстрых и простых методов компьютерного моделирования является метод молекулярного докинга реализованного в различных программах. Программа Autodock широко используется в комбинации с различными экспериментальными методами и позволяет определять структуру белок-лигандного комплекса и рассчитывать энергию взаимодействия с экспериментальной точностью.

Метод WaterLOGSY и молекулярный докинг являются комплементарными, универсальными методами для быстрого скрининга и нахождения лигандов взаимодействующих с белком.

При введении в кровь большинство лекарственных соединений образуют комплексы с белками плазмы крови, и их дальнейшая транспортировка по кровеносной системе происходит в составе белок-лигандных комплексов. Одним из наиболее распространенным белком плазмы крови является сывороточный альбумин, доля которого составляет около 60% от суммарного количества белков крови. Альбумин вызывает большой интерес фармацевтической промышленности, поскольку он может

связывать значительное число лигандов различной химической структуры, таких как биологически активные вещества, жирные кислоты, неорганические ионы, а также лекарственные вещества и их метаболиты. Таким образом, при дизайне лекарственных препаратов важно прояснить структуру, функцию и свойства белок-лигандных комплексов.

**Цель работы:** Исследовать образование комплекса человеческого сывороточного альбумина с нуклеозидами методом ЯМР спектроскопии  
соответствии с данной целью были поставлены следующие **задачи:**

1 Изучение импульсной последовательности WaterLOGSY на примере взаимодействия нуклеозидов с белком сывороточного альбумина человека.

2 Из анализа спектров WaterLOGSY определить константы диссоциации комплекса методом спектроскопии ядерного магнитного резонанса.

3 Изучение молекулярного докинга с использованием программы AutoDock на примере взаимодействия нуклеозидов с сывороточным альбумином человека.

4 Анализ и сравнение экспериментальных данных полученных методом спектроскопии ядерного-магнитного резонанса и теоретических результатов, полученных методом молекулярного докинга.

Объектами исследования являются сывороточный альбумин человека и нуклеозиды.

В данной работе методы ЯМР спектроскопии и молекулярного докинга были применены для изучения взаимодействия биологически активных препаратов с сывороточным альбумином человека. Показано преимущество совместного применения метода WaterLOGSY и молекулярного докинга. Методом WaterLOGSY определены константы диссоциации белок-лигандных комплексов, которые были подтверждены расчетами энергии взаимодействия человеческого сывороточного альбумина с лигандами. Кроме того, докинг был применен для определения структуры образованных

комплексов и анализа аминокислотных остатков играющих ключевую роль в образовании комплексов.

Работа проводилась на ЯМР спектрометре высокого разрешения «Bruker Avance III 600» фирмы «Bruker» в ЯМР лаборатории биофизической химии наносистем Казанского института биохимии и биофизики КазНЦ РАН.

# 1 Теоретическая часть

## 1.1 Ядерный магнитный резонанс

Принцип ЯМР заключается в том, что многие ядра имеют спин и все ядра электрически заряжены. Если приложено внешнее магнитное поле, возможна передача энергии между базовой энергией на более высокий энергетический уровень (обычно один энергетический зазор). Передача энергии происходит на длине волны, соответствующей радиочастоте, и когда спин возвращается на свой базовый уровень, энергия излучается на той же частоте. Сигнал, который соответствует этой передаче, измеряется многими способами и обрабатывается, чтобы получить спектр ЯМР для соответствующего ядра [1, 2].

ЯМР наблюдается только на ядрах с ненулевым механическим моментом  $J$  и, соответственно, с ненулевым магнитным моментом  $\mu$ .

Для того, чтобы наблюдать явления ЯМР, необходимо систему спинов погрузить в постоянное магнитное поле  $H_0$  и переменное поле  $H_1$  с частотой  $\omega_1$ . Если энергия поглощения  $\hbar\omega_1$  равно расстоянию между энергетическими уровнями  $\gamma\hbar H_0$ , то образование переходов в системе вновь нарушает больцмановское распределение. Как только переменное поле прекратит своё действие, система самостоятельно возвратится к равновесию благодаря ЯМР. Эти явления ядерного магнитного резонанса- электромагнитной энергии с спином ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{27}\text{Al}$  и др.) отличным от нуля в постоянном магнитном поле. Так как параметры ЯМР, несущие информацию о состоянии и физических свойствах жидкости, зависящие напрямую от структуры и свойств пористой среды.

Если поместить это ядро во внешнее магнитное поле  $H_0$ , то магнитный момент ядра начнет менять свою ориентацию в основном вдоль направления этого поля согласно литературными данными [2]. Спиновые состояния,

которые ориентированы по направлению постоянного магнитного поля, обладают меньшей энергией, чем спины, направленные против этого поля. При воздействии на эту систему радиочастотным (РЧ) магнитным полем  $H_1$  происходит нарушение равновесного распределения ядер. Вследствие чего ядро может поглотить квант РЧ поля и перейти в состояние с большей энергией как показано на рисунке 1.

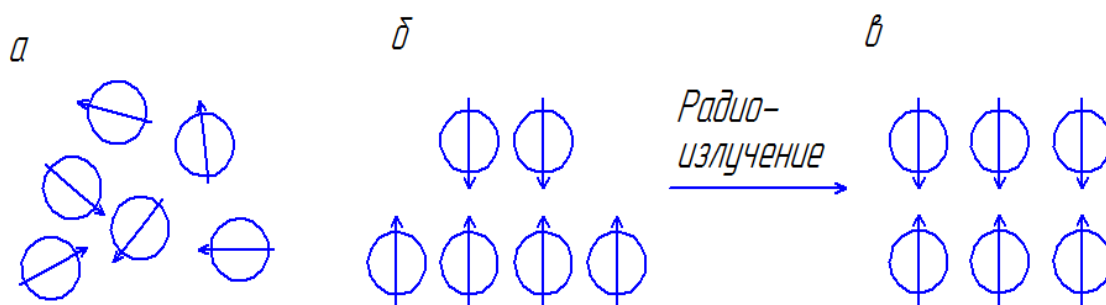


Рисунок 1 – Поведение магнитных моментов в магнитном поле: а – в отсутствие магнитного поля; б – во внешнем магнитном поле; в – во внешнем магнитном поле после поглощения радиочастотного излучения (спины занимают более высокий энергетический уровень) [1]

Ядра, находящиеся в разных частях молекулы, могут иметь совершенно разное эффективное магнитное поле в зависимости от окружения. Таким образом, мы можем регистрировать спектр ЯМР. Анализируя этот спектр, можно получить информацию о количестве атомов, их пространственном расположении в молекуле.

Магнитный момент существует у тех ядер, у которых имеется внутренний момент количества движения. Если поместить такой магнитный момент в магнитное поле  $H_0$ , то возникнет их взаимодействие согласно рисунку 2.

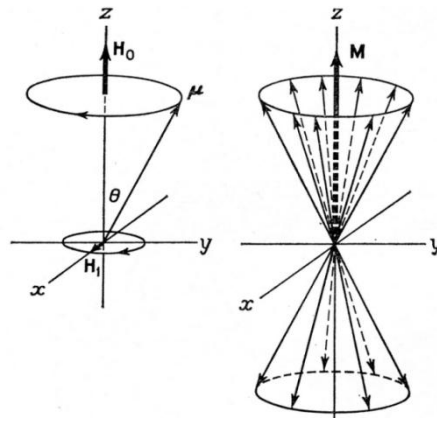


Рисунок 2 - Движение магнитного момента ядра в постоянном магнитном поле  $H_0$ , где  $\underline{M} = \sum_i \mu_i$  – суммарный магнитный момент ядер

Энергии взаимодействия определяется следующим образом:

$$E = -(\underline{\mu}, \underline{H}_0), \quad (1)$$

Ось  $Z$  системы направляют вдоль статического поля, которое прилагают к образцу. Поэтому формулу (1) можно записать так:

$$E = -\mu_z H_0, \quad (2)$$

Из квантовой механики следует, что внутренний момент количества движения не может быть произвольным по величине и не может занимать в пространстве произвольные ориентации. Т.е. он квантуется по величине и направлению. Определенные ориентации момента количества движения характеризуют квантовые числа  $I$  и  $m$ , где  $I$  – спин ядра,  $m$  – квантовое число проекции на ось  $Z$ . Квантовое число  $m$  максимально, когда спин направлен по полю  $H_0$ . При отклонении спина на разрешенные положения квантовое число  $m$  принимает значения  $I-1$  и т.д.

$$m = I, I - 1, \dots, -I$$

Изотопы, у которых и массовое число, и атомный номер четные, имеют  $I=0$ , а изотопы с нечетными массовыми числами имеют полуцелые значения спина.

Из этого следует, что энергия принимает дискретные значения.

$$\mu_z = \mu \frac{m}{I}, \quad (3)$$

Отсюда мы можем получить, что энергия может принимать  $2I+1$  значений. Правилами отбора разрешены состояния только с  $\Delta I = 0$  и  $\Delta M_z = \pm 1$ .

При переходе между такими состояниями происходит либо поглощение, либо выделение кванта энергии:

$$\Delta E = E_{m_z} - E_{m_z-1} = -(\gamma \hbar m_z - \gamma \hbar (m_z - 1)) H_0 = \gamma \hbar H_0, \quad (4)$$

где  $\gamma$  – гиромагнитное отношение;  $\hbar = 1.054 \cdot 10^{-34}$  – редуцированная постоянная Планка или постоянная Дирака.

Энергия кванта связана с частотой кванта  $\omega$  соотношением:

$$\Delta E = \hbar \omega \quad (5)$$

Получается, что частота излучения ядер определяется формулой:

$$\omega_0 = \gamma H_0 \text{ или } \nu_0 = \frac{\gamma}{2\pi} H_0 \quad (6)$$

При вынуждении энергетических переходов происходят совсем небольшие изменения состояния вещества. Так как эти кванты маленькие, то излучение или поглощение их приводит к ничтожным изменениям физико-химических состояний вещества. Это очень важно, т.к. в итоге получаем способ, который не изменяет состояния исследуемого образца.

Сумма комбинации магнитных моментов ядер может быть записана как макроскопическая намагниченность  $\underline{M}$ .

$$\underline{M} = \sum_i \mu_i, \quad (7)$$

Нужно подобрать такую вращающуюся систему координат, в которой этот вектор  $\underline{M}$  неподвижен. Это условие выполняется при частоте вращения системы координат равной  $\omega_0$ :

$$\omega_0 = \gamma H_0 \quad (8)$$

Частота  $\omega_0$  – частота ларморовой прецессии и частота ЯМР. Для того чтобы наблюдать это явление, необходимо приложить к уже существующей системе радиочастотное магнитное поле  $H_1$  в соответствии с рисунком 2.

Уравнение движения магнитного момента в магнитном поле  $H_0$ :

$$\frac{dM}{dt} = [H_0, M] \quad (9)$$

Эта величина максимальна, когда угол  $\alpha$  (угол между  $H_0$  и  $M$ ) равен  $90^\circ$ . Поэтому на практике одним из основных видов импульса является  $90^\circ$  импульс. Такой импульс достигается выполнением условий, описанных уравнениями:

$$\frac{\pi}{2} = \omega_1 \tau = \gamma H_1 \tau, \quad (10)$$

$$\tau_{\pi/2} = \frac{\pi}{2\gamma_H H_1}, \quad (11)$$

где  $\omega_1$  – частота прецессии вокруг  $H_1$ ;  $\tau$  – время воздействия поля  $H_1$  на систему;  $\gamma_H$  – характеристика ядер;  $H_1$  – мощность импульса.

"Спад свободной индукции" (ССИ) - получение изображения в импульсной спектроскопии затухающих резонансных колебаний, в которых намешаны все сигналы от всех резонирующих ядер. Для преобразования спектра применяют преобразование Фурье – это математическая операция, которая позволяет разложить любую функцию, зависящую от времени, на элементарные составляющие – гармонические колебания с разными частотами и амплитудами.

## 1.2 Основные параметры спектров ЯМР высокого разрешения

### 1.2.1 Химический сдвиг

В растворе  $^{14}\text{N}$  аммиачной селитры в 1950 году было обнаружено два сигнала ЯМР. Неожиданный результат было названо «неприятным химическим эффектом». Таким образом, было открыто явление химических сдвигов, когда в атомах и молекулах резонансные сигналы ЯМР сдвигаются под влиянием экранирующего действия электронных оболочек [3].

В этом случае следовало ожидать появление одиночного сигнала для каждого типа ядер ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  и т. д.) в спектре ЯМР. В таком случае ЯМР-спектроскопия не представляла бы большого интереса как метод исследования строения вещества. При помещении исследуемых веществ в постоянное магнитное поле  $B_0$  возникает противоположный по направлению к  $B_0$  диамагнитный момент атомов, обусловленный индуцированным орбитальным движением электронов (рисунок 3).



Рисунок 3 – Схематическое представление возникновения вторичного магнитного поля  $B_{\text{лок}}$

Движение электронов образу в молекулах эффективные токи, и создается вторичное магнитное поле  $B_{\text{лок}}$ , которое также действует на ядро. Индуцированные токи так как пропорциональны приложенному полю  $B_0$ , вторичное поле  $B_{\text{лок}}$  также пропорционально магнитному полю  $B_0$ . В диамагнитных молекулах эффективное магнитное поле  $B_{\text{эф}}$ . На различных ядрах всегда меньше поля  $B_0$ , т.е. ядра экранированы:

$$B_{\text{эф}} = B_0 - \sigma B_0 = (1 - \sigma) B_0 \quad (12)$$

Константа экранирования  $\sigma$  – величина безразмерная и в основном определяется электронной плотностью на рассматриваемом ядре. Для ядра  $^1\text{H}$   $\sigma$  порядка  $10^{-5}$ , для более тяжелых ядерона имеет большие значения, поскольку экранирование растет с ростом числа электронов у атома. От

магнитного поля  $\gamma$  не зависит, т.к. является молекулярной константой. Величина магнитного намного больше чем величина испытываемого ядра. Следовательно, с учетом уравнения  $\nu = \frac{\gamma B_0}{2\pi}$  преобразуется в уравнении:

$$\nu_1 = \left(\frac{\gamma}{2\pi}\right) (1 - \sigma) B_0 \quad (13)$$

где  $\sigma$  – известен как константа экранирования. Это независимый от поля фактор, связанный с химическим окружением ядер. Каждый изотоп имеет своё значение, но значения всех изотопов намного меньше 1.

В квантово-механических представлениях эффект экранирования заключается в уменьшении расстояния между энергетическими уровнями или, иными словами приводит к сближению зеемановских уровней (рис 4). Кванты энергии вызывающие переходы между уровнями, становятся меньше и резонанс создается при меньших частотах.

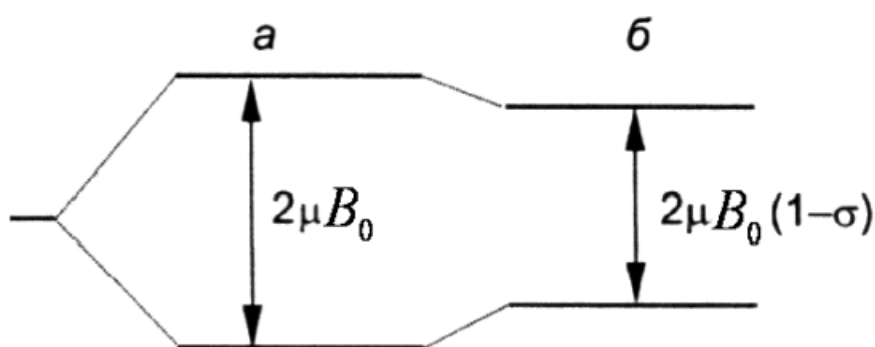


Рисунок 4 – Влияние электронного экранирования на зеемановские уровни ядра: а – неэкранированного, б – экранированного

При анализах спектров ЯМР, ядер одного вида в разном химическом окружении, т.е. ядер, находящихся либо в разных молекулах, либо в химически различных положениях в одной и той же молекуле, обнаруживается соответствующий набор констант экранирования. Следовательно, из выражения (13) следует, что чем больше константа экранирования, тем меньше резонансная частота [4].

*Химический сдвиг  $\delta$ .* Различные изотопы ядра в различных функциональных группах сигналов ЯМР лежат в разных областях. Тетраметилсилан (ТМС) представляет из себя органическое соединение, алкилпроизводное моносилана, бесцветный жидкость которая выбрано в качестве стандарта и пик которого устанавливается как источником спектральной абсциссы ЯМР. В построении положениях всех пиков функциональных групп соединения определяются таким образом:

$$\delta = \frac{\nu_{sample} - \nu_{standard}}{\nu_{standard}} * 10^6 \quad (14)$$

где  $\nu_{sample}$  и  $\nu_{standart}$  являются образцом и стандартными частотами функциональной группы.

Явление химический сдвиг обозначается символом  $\delta$ , и показывает положение пика для определенной функциональной группы и выражается миллионных долях, которое безразмерна. В соответствии нахождении сигнала от стандарта определяется его знак т.е. знак отрицателен, когда сигнал расположен справа от стандарта и аналогично с другим [5]. Ниже показано обобщенные области химических сдвигов протон на рисунке 5.

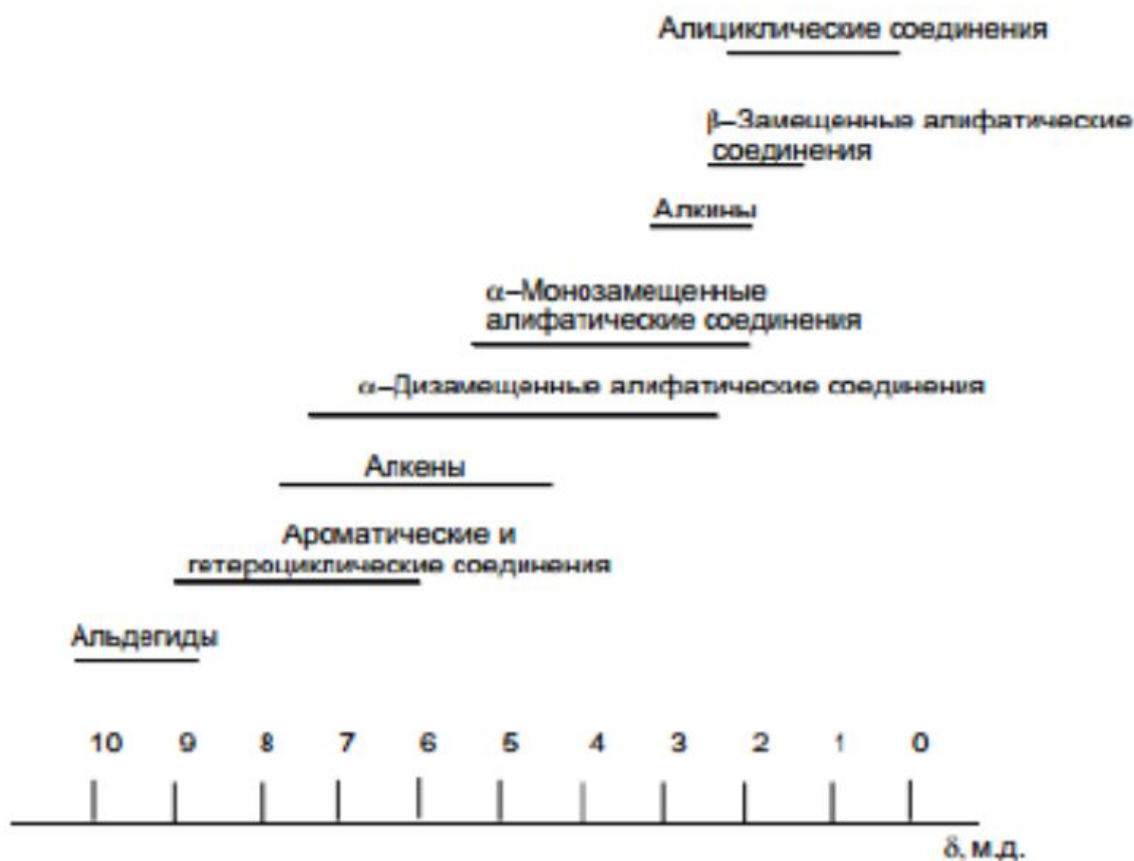


Рисунок 5 – Области химических сдвигов протонов

### 1.3 Ядерный эффект Оверхаузера

Ядерный эффект Оверхаузера (NOE) - это изменение интегральной интенсивности поглощения ядерного магнитного резонанса (ЯМР) ядерного спина, когда поглощение ЯМР другого спина становится насыщенным. Вовлеченные спины могут быть либо гетеро-ядерными, либо химически сдвинутыми гомо-ядерными спинами. Ядерный эффект Оверхаузера был предсказан в 1953 г. А. Оверхаузером для взаимодействия спиновых систем электронов [6].

Речь идет о прямом магнитном взаимодействии (дипольном взаимодействии) между ядрами, которое обычно не оказывает заметного влияния на спектры, регистрируемые в растворе.

NOE  $\Rightarrow$  Диполярная связь  $\Rightarrow$  Межмолекулярные расстояния и молекулярное движение.

Физический процесс, лежащий в основе NOE - ядерная релаксация

Как? Путем насыщения некоторых сигналов (устранение разницы населенностей на некоторых переходах за счет, облучая их слабым радиочастотным полем), наблюдая за сигналами от других. NOE тогда проявляет попытки системы оставаться в равновесии.

Количественное определение:

$$\eta_i(s) = (I - I_0)/I_0 \quad (15)$$

где  $I_0$  - нормальная интенсивность резонанса, а  $I$  - интенсивность, наблюдаемая при насыщении некоторых других связанных резонансов,  $\eta_i(s)$  указывает, что это ЯЭО в ядре  $i$ , когда ядро  $s$  насыщено.

Двухспиновая гомоядерная система. Два ядра со спином  $1/2$   $i$  и  $s$  в одной молекуле,  $J_{is} = 0$  (рисунок 6).

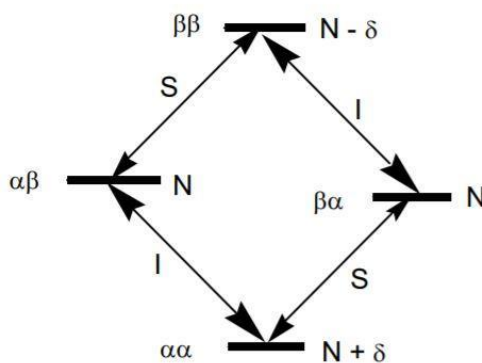


Рисунок 6 – Двухспиновая гомоядерная система

Различия между участками:

$i$  переходы:  $\alpha\alpha - \alpha\beta$  и  $\beta\alpha - \beta\beta \Rightarrow \delta$

$s$  переходов:  $\alpha\alpha - \beta\alpha$  и  $\alpha\beta - \beta\beta \Rightarrow \delta$

$\Delta M = 0$  переход:  $\beta\alpha - \alpha\beta \Rightarrow 0$

$\Delta M = 2$  переход:  $\alpha\alpha - \beta\beta \Rightarrow 2\delta$

Переходы, соответствующие  $\Delta M = 0$  и  $\Delta M = 2$ , не наблюдаются в спектрах ЯМР при нормальных условиях, но они могут быть вовлечены в релаксацию: если эти различия нарушаются, то система попытается восстановить их.

Возможные пути релаксации:

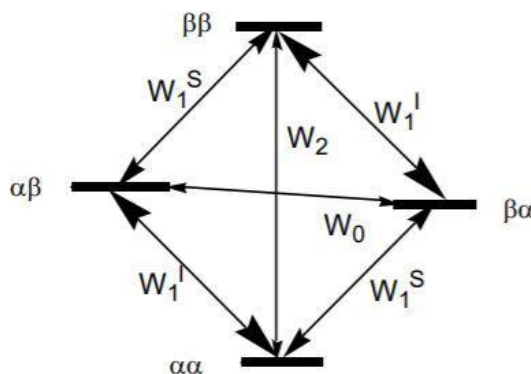


Рисунок 7 – Пути релаксации,  $W$  - константы скорости различных процессов

Сделано предположение: релаксация - это процесс 1-го порядка, т. е. она пропорциональна степени.

Если переходов  $\Delta M = 0$  и  $\Delta M = 2$  не произошло, то

$$T_1^i = 1 / (2W_1^i). \quad (16)$$

В противном случае полная скорость релаксации для ядра  $i$  должна включать разности ядра  $s$ .

Если в качестве путей релаксации активны только одиночные квантовые переходы, насыщение  $s$  не влияет на интенсивность  $i$ . Если  $W_0$  является доминирующим путем релаксации, насыщение  $s$  снижает интенсивность сигналов из-за  $i$  (отрицательное ЯЭО). Если  $W_2$  является доминирующим путем релаксации, насыщение  $s$  увеличивает интенсивность сигналов из-за  $i$  (положительный ЯЭО).

$$\eta_i(s) = W_2 - W_0/W_0 + 2W_1^i + W_2,$$

$\eta_i(s) > 0$  для малых молекул,  $\eta_i(s) < 0$  для макромолекул

Гетероядерный случай:

$$\eta_i(s) = \frac{W_2 - W_0}{W_0 + 2W_1^i} \frac{\gamma_s}{\gamma_i}$$

Полная скорость релаксации  $\rho_i = W_0 + 2W_1^i + W_2$

Скорость кросс-релаксации  $\sigma = W_2 - W_0$

$$\eta_i(s) = \frac{\sigma}{\rho_i} \frac{\gamma_s}{\gamma_i} \quad (17)$$

В растворе быстрое движение молекул усредняет дипольное взаимодействие по всем возможным ориентациям молекулы. Быструю переориентацию дипольного взаимодействия можно рассматривать как источник флуктуирующего поля. Из общих механизмов только дипольная релаксация имеет члены кросс-релаксации ( $W_0$  и  $W_2$  процессы), и наблюдение NOE является диагностическим признаком этого типа релаксации. Случайные движения можно охарактеризовать одним параметром - временем корреляции  $\tau_c$ . Если молекула перемещается из одной ориентации в другую, и каждое движение происходит мгновенно, тогда будет случайное распределение «времен ожидания» при каждой ориентации:  $\tau_c$  выбирается таким, чтобы время ожидания было меньше, чем  $\tau_c$  встречаются редко. Макромолекулы с высоким молекулярным весом - длиннее  $\tau_c$

Скорости релаксации за счет дипольной связи в системе двух спинов:

$$W_1^i \sim \frac{3 \tau_c}{r^6 (1 + \omega_i^2 \tau_c^2)} \quad (18)$$

$$W_0 \sim \frac{2 \tau_c}{r^6 (1 + (\omega_i - \omega_s)^2 \tau_c^2)} \quad (19)$$

$$W_2 \sim \frac{12 \tau_c}{r^6 (1 + (\omega_i - \omega_s)^2 \tau_c^2)} \quad (20)$$

где  $\omega_i$  и  $\omega_s$  - ларморовские частоты двух ядер.

Медленно падающие молекулы практически не двигаются при  $2\omega$  ( $\approx \omega_i + \omega_s$ ), а  $W_0$  превышает  $W_2$ . Это предел, в котором  $\omega^2 \tau_c^2 \gg 1$ , называется пределом спиновой диффузии (ЯЭО отрицательный).

В пределе крайнего сужения ( $\omega^2 \tau_c^2 \ll 1$ ):

$$W_1^i \sim \frac{3\tau_c}{r^6} \quad W_0^i \sim \frac{2\tau_c}{r^6} \quad W_2 \sim \frac{12\tau_c}{r^6}$$

Гомоядерный случай:

$$\eta_i(s) = \frac{W_2 - W_0}{W_0 + 2W_1^i} = \frac{(12 - 2)\tau_c/r^6}{(6 + 12 + 2)\tau_c/r^6} = \frac{1}{2} \quad (21)$$

Гетероядерный случай:

$$\eta_i(s) = \frac{1}{2} \frac{\gamma_s}{\gamma_i} \quad (22)$$

*Максимальная* положительная гомоядерная ЯЭО мы всегда можем получить 50%. Для случая  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  максимальное усиление составляет около 200%. Благодаря такому значительному увеличению чувствительности обычные спектры  $^{13}\text{C}$  обычно получают с помощью широкополосного протонного облучения. Зависимость от  $\gamma$  приводит к другому рассмотрению для те ядра с отрицательными значениями  $\gamma$  (например,  $^{15}\text{N}$  и  $^{29}\text{Si}$ ), поскольку они покажут *отрицательное* усиление. Для примера,  $\gamma_{\text{H}}/\gamma_{\text{Si}} \approx -5$ , максимальный ЯЭО = -250%, т. е. если полный ЯЭО не реализуется, улучшения близкие к -100% может привести к потере сигнала.

Усиление ЯЭО обратно пропорционально  $i$  полной скорости релаксации спина ( $\rho_i$ ). Если  $i$  вращается быстро и релаксирует из-за других механизмов релаксации, тогда общая скорость релаксации становится большой и усиление сигнала из-за ЯЭО уменьшается. Например, спин  $i$

может эффективно взаимодействовать с непарными электронами. Магнитный момент электрона примерно в 2000 раз больше, чем у протона. В наличие парамагнитных материалов (например, парамагнитных молекул кислорода в растворах) межмолекулярных сильных взаимодействий и приводят к очень короткому времени релаксации. Для ядер со спином больше  $\frac{1}{2}$ . Механизм квадрупольной релаксации становится доминирующим, и ЯЭО не имеет значения.

Переходной ЯЭО (ТОЕ). Сама ЯЭО зависит от конкурирующего баланса между различными путями релаксации, но начальная скорость, с которой он растет, зависит только от скорости кросс-релаксации ( $\sigma$ ): при постоянном  $\tau$  с это будет просто зависят от межъядерного расстояния. Поскольку насыщение не может быть достигнуто мгновенно, селективный используется инверсия спина  $s$ :

$$(180^\circ)_{\text{SEL}} - \tau_m - 90^\circ - \text{захват}$$

Наблюдается рост ЯЭО  $i$  – спины в зависимости от времени. Поскольку  $\sigma \sim r^{-6}$ , это может быть использовано для оценивания межъядерное расстояния. Обычно известное фиксированное расстояние в пределах одной и той же молекулы используется для откалибровать кривую нарастания (Переходной ЯЭО (ТОЕ) в зависимости от  $\tau_m$ ).

Переходной NOE во вращающейся рамке (ROE)

$$(180^\circ)_{\text{SEL}} - 90^\circ - \tau_m \text{ (блокировка вращения) - захват}$$

Два важных следствия:

- (1) ROE всегда положительный (38,5% для  $\omega\tau_c \ll 1$  и 67,5% для  $\omega\tau_c \gg 1$ ), и нет «сложный регион»  $\omega\tau_c$ . Для молекул промежуточного размера (с  $M_w \sim 1000$  Да)  $\omega\tau_c$  близка к 1;
- (2) эффекты мультиспина будут незначительными.

## 1.4 Метод WaterLOGSY

ЯМР является мощным методом идентификации соединений, которые взаимодействуют с макромолекулами, включая белки и фрагменты ДНК или РНК [8]. Белок-лигандного за последние несколько лет скрининг ЯМР приобрел одним из важных мест в целевых программах обнаружения лекарств в медицине. [9] Было предложено несколько методов скрининга смесей соединений против поставленной задачи [10-14]. Одним из данных методов являлся метод Water-LOGSY (Water-Ligand Observed via Gradient Spectroscopy).

Метод Water-LOGSY - способ первичного ЯМР скрининга и идентификации связывания лиганда с белком даже в том случае, когда константа диссоциации образца лежит в миллимолярной области величин. Благодаря высокой чувствительности данного метода для идентификации активных компонентов значительно уменьшает количество материала и время для процесса ЯМР-скрининга.

Хорошо отработанной технологией для идентификации малых молекул является скрининг на основе ядерного магнитного резонанса [15-16]. ЯМР-спектроскопия позволяет обнаруживать лиганды с константами диссоциации ( $K_d$ ) в диапазоне от наномолярных до миллимолярных значений. Для наблюдения и анализа белок-лигандного взаимодействия в ЯМР-спектроскопии во многих случаях должен быть помечен изотоп. Метод Water-LOGSY для стандартных изменений молекулярная масса белка ограничивается и не должно превышать менее 30 кДа. Диапазон размеров может быть расширен даже до 800 кДа с помощью комбинированного использования оптимизированной дейтерированием и поперечной релаксацией спектроскопии [17].

Метод WaterLOGSY основан на явлении ЯЭО (Ядерный Эффект Оверхаузера). В импульсной последовательности селективно возбуждают

протоны воды и это возбуждение за счет механизмов ЯЭО переносится на молекулы лиганда (рисунок 9). В спектре ЯМР для малых молекул, таких как лиганд, релаксационные процессы будут отражаться с отрицательной фазой, а при белок-лигандном взаимодействии положительную фазу. Требованием для использования этого способа является наличие равновесия между свободными лигандами и связанной формой, при этом ограничение по размеру белка исключаются.

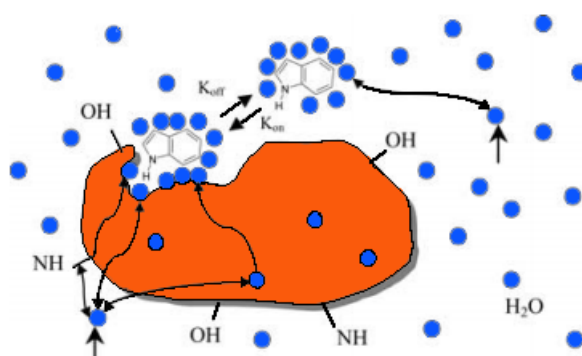


Рисунок 8 – Метод WaterLOGSY. Белок показан с погребенными полостями и активным местом связывания. Лиганд показан в связанном и свободном состояниях. При возбуждении протонов воды

### 1.5 Импульсная последовательность метода WaterLOGSY

Импульсная последовательность данного метода (рис 9) состоит из несколько блоков: насыщение сигнала воды, блок подавления воды, считывание сигнала свободной индукции, период смешивания[18].

Преобразуя классическую импульсную последовательность методом включения блока двухимпульсного градиентного спинового эха DPFGE для нормального насыщения резонанса протонов воды [19]. Такая модификация обеспечила оптимальную селективную инверсию сигнала воды без видимых фазовых искажений, присутствующие при работе с классическими селективными импульсами. Дополнительный жесткий 180° импульс в

середине периода смешивания необходим для гашения помех, которые возникают из-за немного не полной релаксации протонов малых молекул в течение длинного периода смешивания.

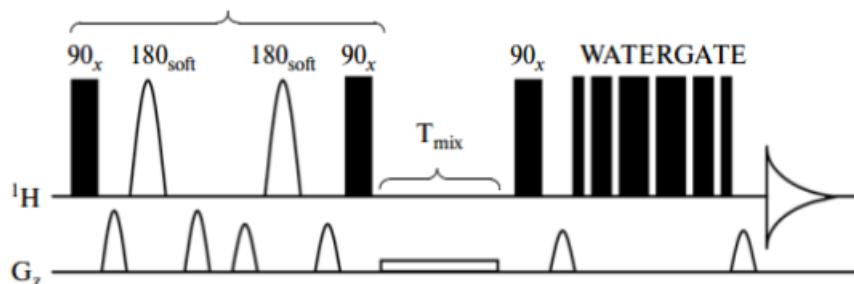


Рисунок 9 – Импульсная последовательность метода WaterLOGSY

### 1.5.1 Определение константы диссоциации методом WaterLOGSY Спектроскопии.

Константу диссоциации определяли из серии спектров WaterLOGSY, измеренных при различных концентрациях лиганда. Для каждой концентрации лиганда [L] измеряли интенсивности сигналов  $I_i$  в спектрах WaterLOGSY. В контрольном эксперименте измеряли спектры WaterLOGSY при тех же концентрациях лиганда, но в отсутствии белка.

Интенсивность сигнала  $i$  в экспериментах WaterLOGSY определяется вкладами эффектов переноса намагниченности от сигнала воды к сигналам свободной (L) и связанной с белком (LP) формам лиганда и выражается в первом приближении следующим уравнением:

$$I_i \propto \sigma^{LP}[LP] + \sigma^L[L], \quad (23)$$

$$\sigma^{LP} = (\sum_j \sigma_{ij}^{bound} + \sum_k \sigma_{ik}^{bound} + \sum_w \sigma_{iw}^{bound}), \quad (24)$$

$$\sigma^{LP} = (\sum_j \sigma_{ij}^{bound} + \sum_k \sigma_{ik}^{bound} + \sum_w \sigma_{iw}^{bound}), \quad (25)$$

где  $[LP]$  и  $[L]$  – концентрация связанной и свободной форм лиганда соответственно, а члены  $\sigma$  соответствуют скоростям переноса намагниченности протонам связанной  $\sigma^{LP}$  или свободной  $\sigma^L$ -формы лиганда. Индексы  $j$  определяют протоны лиганда, способные к обмену с протонами воды (ОН, NH и т.п.). Индексы  $k$  – протоны белка, расположенные вблизи лиганда в комплексе белок-лиганд, а  $w$  – протоны молекул воды, расположенных вблизи лиганда [34]. Вклад свободной формы лиганда в интенсивность сигнала  $i$  в спектре WaterLOGSY ( $I_i^0 = \sigma^L [L]$ ) можно измерить в контрольном эксперименте в отсутствие белка. В этом случае разница интенсивностей сигнала лиганда  $\Delta I_i$  в экспериментах WaterLOGSY, проведенных в присутствии и в отсутствие белка, может быть выражена достаточно простым уравнением

$$\Delta I_i = I_i - I_i^0 = \sigma^{LP} [LP], \quad (26)$$

Используя выражение 26 и тот факт, что концентрация лиганда в экспериментах WaterLOGSY существенно превышает концентрацию белка (вследствие чего  $[L] \sim [L]_0$ ), можно легко определить  $K_d$  из наклона зависимости  $\Delta I_i/[L]_0$  от  $\Delta I_i$  в координатах Скэтчарда:

$$\frac{\Delta I_i}{[L]_0} = \frac{[P]_0 \Delta \sigma^{LP}}{K_d} - \frac{1}{K_d} \Delta I_i. \quad (27)$$

## 1.6 Молекулярный докинг

На протяжении последних лет одним из методов для изучения и разработки лекарственных препаратов является компьютерное молекулярное моделирование. Молекулярное моделирование – набор вычислительных

методов для исследования структуры и свойств молекул. Одним из методов моделирования является молекулярный докинг.

Молекулярный докинг - это своего рода биоинформационное моделирование, которое включает взаимодействие двух или более молекул для получения стабильного взаимодействия. В зависимости от связывающих свойств лиганда и белка, он предсказывает с достаточной степенью точности, конформацию низкомолекулярных лигандов в соответствующем сайте связывания мишени. После разработки первых алгоритмов в 1980-х годах молекулярный докинг стал важным инструментом для открытия лекарств [20].

Молекулярный докинг является основным методом для разработки лекарств. Информация, полученная из метода докинга, может быть использована для определения энергии связи, свободной энергии и стабильности комплексов. Основная цель молекулярного докинга - получить комплекс белок-лиганд с оптимизированной конформацией и с намерением обладать меньшей свободной связывающей энергией [21].

Практическое применение молекулярного докинга требует наличия трехмерной структуры белка, размещенного, как правило, в банке данных PDB. PDB - Protein Data Bank, это банк данных 3D структур нуклеиновых кислот и белков. Применяя разное программное обеспечение (например, HyperChem) есть возможность подготовить лиганды в формате PDB. Молекулярный докинг малых молекул с мишенью (с белком) включает в себя заранее определенную выборку возможной конформации лиганда в конкретном месте мишени с целью установления оптимизированной конформации комплекса. Поскольку инфракрасная спектроскопия, рентгеновская кристаллография и спектроскопия ЯМР являются методами исследования и установления трехмерных структур любой органической молекулы/биомолекулярных мишеней. Следовательно, моделирование позволяет определить предварительную структуру белков неизвестной

структуры с высокой гомологией последовательности к известной структуре. Это обеспечивает альтернативный подход к установлению целевой структуры, которая формирует отправную точку для открытия лекарства *in silico*.

Комплекс белок-лиганд играет важную роль в прогнозировании ориентации лиганда, когда он связан с белковым рецептором или ферментом, используя форму и электростатические взаимодействия для количественной оценки. Ван-дер-ваальсовы взаимодействия также играют важную роль, помимо кулоновских взаимодействий и образования водородных связей. Самые ранние методы стыковки основывались на предположении о «замке и ключе», предложенном Фишером, в котором говорилось, что и лиганд, и белок могут рассматриваться как твердые тела, и их сродство прямо пропорционально геометрическому соответствию между их формами [22], а позднее Кошланд предложил рассматривать лиганд и белок в гибкой стыковке [23]. Таким образом, процедура отбора проб в полностью гибкой стыковке белок-лиганд имеет более высокий порядок в отношении количества степеней свободы, чем в гибкой стыковке с жестким рецептором. Следовательно, эти гибкие алгоритмы стыковки не только предсказывают способ связывания молекулы более точно, чем алгоритмы твердого тела, но также и его аффинность связывания относительно других соединений.

Существуют различные доступные базы данных, которые предоставляют информацию о малых молекулах лигандов, таких как CSD (Структурная база данных Cambridge), ACD (Доступный каталог химических веществ), MDDR (Отчет о данных по лекарственным препаратам MDL) и Drugbank. Также существуют программы для теоретической стыковки белков. Это набор инструментов для анализа белков, таких как сравнение трехмерных структур, идентификация сайтов связывания, поиск нековалентных связей, размеры пор ионного канала и т. д. Основная часть работает по такому алгоритму: один белок фиксируется в пространстве, а

второй поворачивается вокруг него разнообразными способами. Для каждой конфигурации поворотов производятся оценочные расчеты. Оценочная функция основана на Ван-дер-Ваальсовом отталкивании, электростатических взаимодействиях, поверхностной комплементарности и т.д. Основная загвоздка в том, что вычисления по всему конфигурационному пространству требуют немало времени, при этом довольно редко приводят к одному варианту решения. Одна из таких ПО - AutoDock.

### 1.6.1 Программный пакет AutoDock

AutoDock [24] - первый стыковочный пакет для моделирования лиганда с полной конформационной гибкостью. Пакет состоит из двух последовательно применяемых программ AutoGrid и AutoDock. AutoGrid изначально используется для расчета нековалентной энергии взаимодействия между жесткой частью рецептора и атомом зонда, который находится в различных точках решетки. Кроме того, AutoGrid создает карту сетки электростатического потенциала и карту десольватации. Полный набор карт сетки и гибкая часть рецептора используются AutoDock для управления процессом стыковки выбранных лигандов.

Основные сильные стороны AutoDock:

- гибкость рецепторов;
- слепая стыковка;
- предварительно рассчитанные сеточные карты на месте привязки;
- функция оценки свободной энергии, основанная на линейном регрессионном анализе, силовом поле AMBER и большом наборе комплексов белок-лиганд с известными константами ингибирования;
- хорошая корреляция между предсказанными константами ингибирования и экспериментальными данными.

AutoDock объединяет два метода: быстрая оценка энергии на основе трехмерной пространственной решетки и эффективный поиск вращательных степеней свободы. AutoDock использует простую функцию для оптимизации, которая выполняет более быстрый метод поиска и обеспечивает воспроизводимые результаты для более крупных систем с более чем 20 подвижными связями.

AutoDock имеет применение в:

- рентгеновской кристаллографии;
- дизайне лекарств на основе структуры;
- оптимизации лидов;
- виртуального просмотра;
- комбинаторного дизайна библиотеки;
- белок-белковой стыковки;
- изучении химического механизма.

Вычислительная стыковка широко используется для изучения взаимодействий белок-лиганд, а также для открытия и разработки лекарств. Обычно процесс начинается с мишени известной структуры, такой как кристаллографическая структура фермента, представляющего медицинский интерес. Затем стыковка используется для прогнозирования связанной конформации и свободной энергии связывания малых молекул с мишенью. Однократные стыковочные эксперименты полезны для изучения функции мишени, а виртуальный скрининг, при котором большая библиотека соединений стыкуется и ранжируется, может использоваться для идентификации новых ингибиторов для разработки лекарств.

Шаг 1 - Подготовка координатного файла. Отформатированные файлы лиганда для AutoDock должны быть в формате PDBQT и содержать типы атомов, поддерживаемые AutoDock, плюс дополнительные записи, которые определяют вращаемые связи: если каждый атом лиганда уже имеет «частичный заряд», эти заряды используются. Если нет или если каждый из

зарядов равен нулю, ADT вычисляет заряды Гастайгера для всего лиганда. Чтобы этот расчет работал правильно, в молекулу уже должны быть добавлены атомы водорода, включая как полярные, так и неполярные, до этого шага. ADT присваивает каждому атому «тип автокрепления». Для большинства элементов тип атома такой же, как и у его элемента.

В этой сводке указан тип используемой платы; количество слитых неполярных атомов водорода, ароматических углеродов, обнаруженных вращающихся связей + количество обнаруженных торсионных степеней свободы (TORSDOF), а также «общая нецелая ошибка заряда», которая представляет собой величину, на которую складывается сумма заряды на атомы отличаются от целого числа.

Шаг 2 – Запуск AutoGrid. AutoDock необходимо уже готовая рассчитанная трехмерная пространственной решетки, по одному для каждого типа атома, присутствующего в соединении. Это помогает ускорить расчеты докинга. Эти решетки строятся с помощью программы AutoGrid. Карта сетки состоит из трехмерной решетки регулярно расположенных точек, окружающих (полностью или частично) и центрированных в некоторой интересующей области исследуемой макромолекулы. Это может быть белок, фермент, антитело, ДНК, РНК или даже полимер или ионный кристалл. Типичное расстояние между точками сетки варьируется от 0,2 Å до 1,0 Å, а значение по умолчанию составляет 0,375 Å. Каждая точка на карте сетки хранит потенциальную энергию «зондового» атома или функциональной группы, которая связана со всеми атомами в макромолекуле.

Шаг 3 - докинг. Молекулярный докинг - это вычислительная процедура, которая пытается предсказать нековалентное связывание макромолекул или, что более часто, макромолекулы (рецептора) и небольшой молекулы (лиганда) эффективно, начиная с их несвязанных структур, структур, полученных при моделировании МД, или моделировании гомологии. и т.д. Цель состоит в том, чтобы предсказать связанные

конформации и аффинность связывания. Предсказание связывания малых молекул с белками имеет особое практическое значение, поскольку оно используется для скрининга виртуальных библиотек молекул, подобных лекарственным средствам, с целью получения данных для дальнейшей разработки лекарств. Докинг также может быть использован для попытки предсказать связанную конформацию известных связующих, когда экспериментальные *голоструктуры* недоступны.

Виджет Torsion Count отображает количество текущих активных облигаций. 14/32 на виджете указывает на то, что в настоящее время активны 14 из максимального разрешенного AutoDock, равного 32. Активные в данный момент связи окрашены в зеленый цвет, связи, которые не могут быть повернуты, окрашены в красный цвет, а связи, которые могут быть повернуты, но в настоящее время отмечены как неактивные, окрашены в фиолетовый цвет. В AutoDock можно поворачивать только одинарные связи, которые не имеют циклов и не связаны с листами. ADT определяет, какие связи можно повернуть. Вы устанавливаете, какие из них должны вращаться, отключая другие в средстве просмотра. По умолчанию амидные связи амидные связи рассматриваются как неповоротные. Обратите внимание, что две связи были инактивированы: связь между атомами N2; 6 и C3; 4 и связь между атомами C21; 26 и N4; 28. Обратите внимание, что текущее общее количество вращаемых связей - 14. Перед тем, как закрыть этот виджет, будьте осторожны, чтобы оставить все связи, кроме двух амидных, активными.

Шаг 4 – Оценка результатов стыковки. После того, как AutoDock успешно завершит повторную оценку, мы должны увидеть результаты в файле журнала. AutoDockTools включает ряд методов для анализа результатов моделирования стыковки, включая инструменты для кластеризации результатов по конформационному сходству, визуализации

конформаций, визуализации взаимодействий между лигандами и белками и визуализации потенциалов средства, созданных AutoGrid.

Vina считается преемником AutoDock 4.2 и имеет новую основанную на знаниях статистическую функцию оценки, которая заменяет полуэмпирическое силовое поле AutoDock. Преимущества Vina перед AutoDock 4.2 заключаются в улучшенной точности и скорости прогнозирования, что связано не только с упрощением функции оценки, но и с возможностью многопоточности при наличии нескольких ядер ЦП.

Хотя упрощенная функция подсчета очков все еще пытается оценить свободную энергию связывания в ккал / моль, отдельные термины, такие как гидрофобный вклад и водородная связь, представлены только в виде относительных весов на выходе.

Вот сводка уравнений, используемых в силовом поле AutoDock.

Коэффициенты свободной энергии. Основанные на молекулярной механике и эмпирические термины умножаются на коэффициенты, которые определяются линейным регрессионным анализом комплексов с известной трехмерной структурой и известными значениями свободной энергии связывания. В уравнениях на этой странице, эти веса  $W_{\text{ВандерВаальса}}$ ,  $W_{\text{H-связь}}$ ,  $W_{\text{элек}}$ ,  $W_{\text{desolv}}$  и  $W_{\text{тор}}$ . В AutoDock 4 эти веса свободной энергии,  $FE\_coeff\_vdW$ ,  $FE\_coeff\_hbond$ ,  $FE\_coeff\_estat$ ,  $FE\_coeff\_desolv$  и  $FE\_coeff\_tors$ , могут быть установлены в файле параметров.

$$\Delta G = (V_{\text{связанный}}^{L-L} - V_{\text{свободный}}^{L-L}) + (V_{\text{связанный}}^{P-P} - V_{\text{свободный}}^{P-P}) + (V_{\text{связанный}}^{P-L} - V_{\text{свободный}}^{P-L} + \Delta S_{conf})$$

или (28)

$$\Delta G = \Delta G_{vdw} + \Delta G_{h.связанный} + \Delta G_{elec} + \Delta G_{sol}$$

где L - относится к «лиганду», а P относится к «белку» в расчете молекулярного докинга белок-лиганд.

Каждый из слагаемых включает оценку дисперсии/отталкивания, водородные связи, электростатическое взаимодействие и энергию десольватации:

$$V = W_{vdw} \sum_{i,j} \left( \frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{r_{ij}^6} \right) + W_{hbond} \sum_{i,j} E(t) \left( \frac{C_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{D_{ij}}{r_{ij}^{10}} \right) + W_{elec} \sum_{i,j} \frac{q_i q_j}{e(r_{ij}) r_{ij}} + W_{sol} \sum_{i,j} (S_i V_j + S_j V_i) e^{\left( \frac{-r_{ij}^2}{2\sigma^2} \right)} \quad (29)$$

Константы W были оптимизированы для калибровки эмпирической свободной энергии на основе набора экспериментально определенных констант связывания. Первый член представляет собой типичный потенциал 6/12 для дисперсионных/отталкивающих взаимодействий. Параметры основаны на силовом поле Amber. Второе слагаемое является направленным слагаемым Н-связи, основанным на потенциале 10/12. Третий член – экранированный кулоновский потенциал для электростатики. Последний член представляет собой потенциал десольватации, основанный на объеме атомов (V), которые окружают данный атом и защищают его от растворителя. По умолчанию AutoGrid [27] и AutoDock используют стандартный набор параметров для силового поля.

## 2 Объекты исследования

### 2.1 Белок

Белки - это большие сложные молекулы, которые играют важную роль в организме. Они выполняют большую часть работы в клетках и необходимы для структуры, функции и регулирования тканей и органов тела.

Белки состоят из сотен или тысяч более мелких единиц, называемых аминокислотами, которые связаны друг с другом длинными цепями. Существует 20 различных типов аминокислот, которые можно комбинировать для получения белка. Последовательность аминокислот определяет уникальную трехмерную структуру каждого белка и его конкретную функцию. Аминокислоты кодируются комбинациями трех строительных блоков ДНК (нуклеотидов), определяемых последовательностью генов.

*Общая характеристика белков.* Белки – самые распространенные биологические макромолекулы, встречающиеся во всех клетках. Это также самая универсальная органическая молекула среди живых систем, и она встречается в большом количестве; тысячи различных видов, от относительно небольших пептидов до крупных полимеров. При полном гидролизе белок превращается в смесь аминокислот.

Как и другие биологические макромолекулы, такие как полисахариды и нуклеиновые кислоты, белки являются важными частями организмов и участвуют практически во всех процессах внутри клеток. Многие белки представляют собой ферменты, катализирующие биохимические реакции и жизненно важные для метаболизма. Белки также выполняют структурные или механические функции, такие как актин и миозин в мышцах и белки в цитоскелете которые образуют систему каркасов, поддерживающих форму клеток. Другие белки важны для передачи сигналов клеток, иммунных

ответов, клеточная адгезия и клеточный цикл. В рационе животных белки необходимы для обеспечения незаменимых аминокислот, которые невозможно синтезировать. Пищеварение расщепляет белки для использования в метаболизме.

*Строение белков.* Линейная последовательность аминокислотных остатков в полипептидной цепи определяет трехмерную конфигурацию белка, а структура белка определяет его функцию. Все белки содержат элементы углерод, водород, кислород, азот и серу, некоторые из них также могут содержать фосфор, йод и следы металлов, таких как ион, медь, цинк и марганец. Белок может содержать 20 различных видов аминокислот. Каждая аминокислота имеет аминогруппу на одном конце и кислотную группу на другом, а также отличительную боковую цепь. Основная цепь одинакова для всех аминокислот, в то время как боковая цепь отличается от одной аминокислоты к другой.

Строение белков можно разделить на четыре уровня организации:

*Первичная структура.* Первичная структура белка состоит из аминокислотной последовательности вдоль полипептидной цепи. Аминокислоты соединены пептидными связями. Поскольку в пептидных связях нет диссоциируемых протонов, заряды на полипептидной цепи обусловлены только N-концевой аминогруппой, C-концевой карбоксильной группой и боковыми цепями аминокислотных остатков. Первичная структура определяет дальнейшие уровни организации белковых молекул.

*Вторичная структура.* Вторичная структура включает различные типы локальных конформаций, в которых атомы боковых цепей не участвуют. Вторичные структуры образуются регулярным повторяющимся паттерном образования водородных связей между атомами основной цепи. Вторичная структура включает  $\alpha$ -спирали,  $\beta$ -листы и другие типы паттернов складывания, которые возникают из-за регулярного повторяющегося

паттерна образования водородных связей. Вторичная структура белка может быть:

1. Альфа-спираль
2. Бета-спираль

А-Спираль представляет собой свернутую вправо нить.

Заместители боковых цепей аминокислотных групп в  $\alpha$ -спирали простираются наружу. Водородные связи образуются между кислородом С=О каждой пептидной связи в цепи и водородом группы NH пептидной связи на четыре аминокислоты ниже нее в спирали. Заместители в боковых цепях аминокислот соответствуют группам NH. Водородная связь в  $\beta$ -листе находится между нитями (между нитями), а не внутри нитей (внутри нитей). Конформация листа состоит из пар, расположенных бок о бок прядей. Карбонильные атомы кислорода в одной цепи водородной связи с атомами водорода соседней цепи. Две нити могут быть параллельными или антипараллельными, в зависимости от того, совпадают ли направления нитей (от N-конца к C-концу) или противоположны. Антипараллельный  $\beta$ -лист более стабилен из-за более хорошо выровненных водородных связей.

*Третичная структура.* Третичная структура белка относится к его общей трехмерной конформации. Типы взаимодействий между аминокислотными остатками, которые создают трехмерную форму белка, включают гидрофобные взаимодействия, электростатические взаимодействия и водородные связи, все из которых нековалентны. Встречаются также ковалентные дисульфидные связи. Он образуется в результате взаимодействий между аминокислотными остатками, которые могут находиться на значительном расстоянии друг от друга в первичной последовательности полипептидной цепи. Гидрофобные аминокислотные остатки имеют тенденцию собираться внутри глобулярных белков, где они исключают воду, тогда как гидрофильные остатки обычно находятся на поверхности, где они взаимодействуют с водой.

*Четвертичная структура.* Четвертичная структура относится к взаимодействию одной или нескольких субъединиц с образованием функционального белка с использованием тех же сил, которые стабилизируют третичную структуру. Это пространственное расположение субъединиц в белке, состоящем из более чем одной полипептидной цепи.

*Физико-химические свойства белков.* Константа диффузии белковых молекул –  $10^6 - 10^8$  см<sup>2</sup>/с, а средний удельный объем –  $0,70 - 0,75$  см<sup>3</sup>/г. В УФ-области спектра, обусловленный наличием ароматических аминокислот, максимум поглощения белков, находится вблизи 280 нм. Резкое увеличение поглощения при 185-240 нм, вызывает пептидные группы при возбуждении электронов атома азота. Одной из важнейших особенностей белков в ИК-области спектра является способность поглощать за счет СО – и NH – групп при  $1600$  и  $3100-3300$  см<sup>-1</sup> [20].

*Молекулярная масса белков.*

Средняя молекулярная масса аминокислоты принята равной 110. Общее количество аминокислот в белке, умноженное на 110, дает приблизительную молекулярную массу этого белка. Различные белки имеют разный аминокислотный состав и, следовательно, их молекулярные массы различаются. Молекулярная масса белков колеблется от 5000 до  $10^9$  Дальтон.

*Свойства белков:*

- 1 Растворимость в воде.
- 2 Взаимоотношения белков с водой сложны.
- 3 Вторичная структура белков во многом зависит от взаимодействия пептидных связей с водой через водородные связи.
- 4 Водородные связи также образуются между белком (альфа- и бета-структуры) и водой. Богатый белком статический шар более растворим, чем спиральные структуры.
- 5 В третичной структуре вода вызывает ориентацию цепей и гидрофильных радикалов за пределы молекулы, в то время как гидрофобные

цепи и радикалы имеют тенденцию реагировать друг с другом внутри молекулы (гидрофобный эффект).

*Денатурация и ренатурация:*

1 Белки могут быть денатурированы такими агентами, как нагревание и мочевины, которые вызывают разворачивание полипептидных цепей, не вызывая гидролиза пептидных связей.

2 Денатурирующие агенты разрушают вторичные и третичные структуры, не затрагивая первичную структуру.

3 Если денатурированный белок возвращается в свое естественное состояние после удаления денатурирующего агента, этот процесс называется ренатурацией.

Некоторые денатурирующие агенты включают:

Физические агенты: тепло, излучение, pH.

Химические вещества: раствор мочевины, который образует новые водородные связи в белке, органические растворители, детергенты.

### **2.1.1 Белок сывороточный альбумин человека**

Сывороточный альбумин человека (САЧ) представляет собой белок 66,5 кДа, синтезируемый печенью. Он содержит 585 аминокислот, имеет высокое содержание цистеина и высокую долю отрицательно заряженных аминокислот, но не содержит углеводов. Три домена молекулы можно изобразить в модели в виде трех теннисных мячей, упакованных в цилиндрический корпус. Зрелая молекула высвобождается после расщепления сигнального пептида (18 аминокислот) и пропептида (6 аминокислот).

САЧ ассоциируется с широким спектром веществ, включая гормоны и лекарства, обладающие гидрофобной областью, и, таким образом, ассоциацию гормона щитовидной железы с САЧ можно рассматривать как

неспецифическую. Жирные кислоты и ионы хлора уменьшают связывание йодтиронина с САЧ. Он имеет четыре сайта связывания йодтиронина.

Биологический  $t_{1/2}$  САЧ больше, чем у TBG и TTR. САЧ составляет более половины общего содержания белка в сыворотке крови и, таким образом, является основным фактором поддержания осмотического давления коллоидов. Несмотря на высокую способность связывать йодтиронин, низкое сродство отвечает за незначительный вклад САЧ в транспорт тироидных гормонов. Таким образом, даже самые заметные колебания концентрации САЧ<sub>1</sub>, включая анальбуминемию, не оказывают существенного влияния на уровень гормонов щитовидной железы.

Сывороточный альбумин человека (САЧ) отвечает за 80% коллоидно-осмотического давления плазмы (25-33 мм рт. Ст.). Его основное клиническое применение – поддержание коллоидного онкотического давления и увеличение объема циркулирующей плазмы с типичной дозировкой, превышающей 10 г на дозу. HSA выделяется путем фракционирования плазмы человека, что влечет за собой возможное заражение вирусами или прионами. Рекомбинантный САЧ (rСАЧ) был успешно получен с использованием метилотрофных дрожжей *Pichia pastoris*. В связи с тем, что клиническое использование инфузии САЧ часто превышает 10 г, препарат rСАЧ требует высокой степени чистоты. rСАЧ, очищенный с помощью технологии Streamline, идентичен pСАЧ, полученному из плазмы (pdСАЧ), без детектируемого компонента маннана из *P. pastoris*. Структурные и функциональные свойства rСАЧ аналогичны свойствам rdСАЧ. Доклинические и клинические испытания подтвердили безопасность и эффективность использования этого препарата rСАЧ при различных болезненных состояниях, таких как геморрагический шок, цирроз с асцитом и других критических клинических состояниях, связанных с объемом плазмы и онкотическим давлением. Помимо использования в

качестве расширителя плазмы, САЧ имеет большой потенциал в качестве биоматериала для других медицинских и фармацевтических применений.

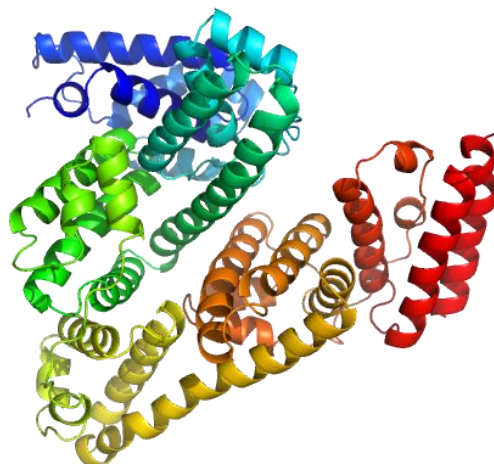


Рисунок 10 – Структура человеческого альбумина (по Bhattacharyaa A.A., Grune T., Currya S., 2000)

Функции. Связывает воду,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ , жирные кислоты, гормоны, билирубин и лекарства (вероятно). Его основная функция - регулирование коллоидно-осмотического давления крови (Вероятно). Основной переносчик цинка в плазме, как правило, связывает около 80% всего цинка в плазме. Основной переносчик кальция и магния в плазме, связывает примерно 45% циркулирующих кальция и магния в плазме (по сходству). Потенциально имеет более двух сайтов связывания кальция и может дополнительно связывать кальций неспецифическим образом (по сходству). Общий сайт связывания между цинком и кальцием в остатке Asp-273 предполагает перекрестное взаимодействие между транспортом цинка и кальция в крови (по сходству). Порядок сродства: цинк > кальций > магний (по сходству). Связывается с бактериальным сидерофором и энтеробактином и ингибирует опосредованное энтеробактином поглощение железа кишечной палочкой из трехвалентного трансферрина и тем самым может ограничивать использование железа и рост кишечных бактерий, таких как кишечная

палочка. Не препятствует захвату железа бактериальным сидерофором аэробактерином.

## 2.2 Нуклеозиды

Нуклеозид представляет собой пуриновое или пиримидиновое азотистое основание, связанное с пентозной сахарной рибозой или дезоксирибозой, т.е. нуклеозид = азотистое основание + рибоза или дезоксирибоза. Нуклеозида представляет собой гликозид, образованный из гидролиза из нуклеиновой кислоты. Когда фосфатная группа ковалентно присоединена к пентозному сахару нуклеозида, она образует нуклеотид, т.е. нуклеотид = нуклеозид + фосфатная группа. В нуклеозиде аномерный углерод присоединен к N9 пурина (или к N1 пиримидина) гликозидной связью.

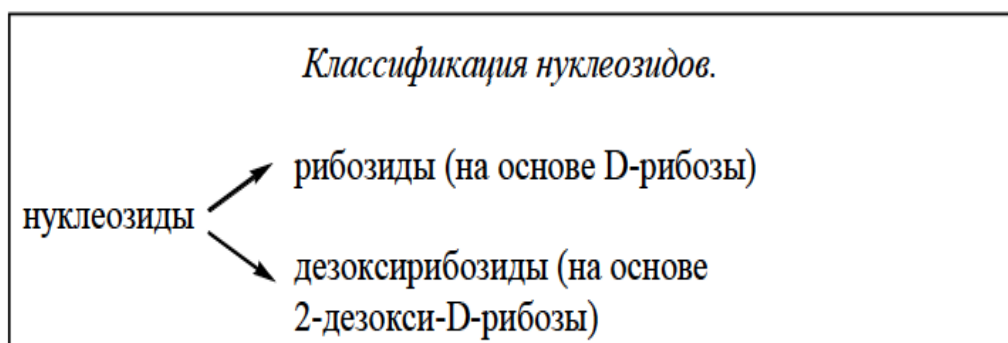


Рисунок 11 – Классификация нуклеозидов

Принцип строения нуклеозидов:

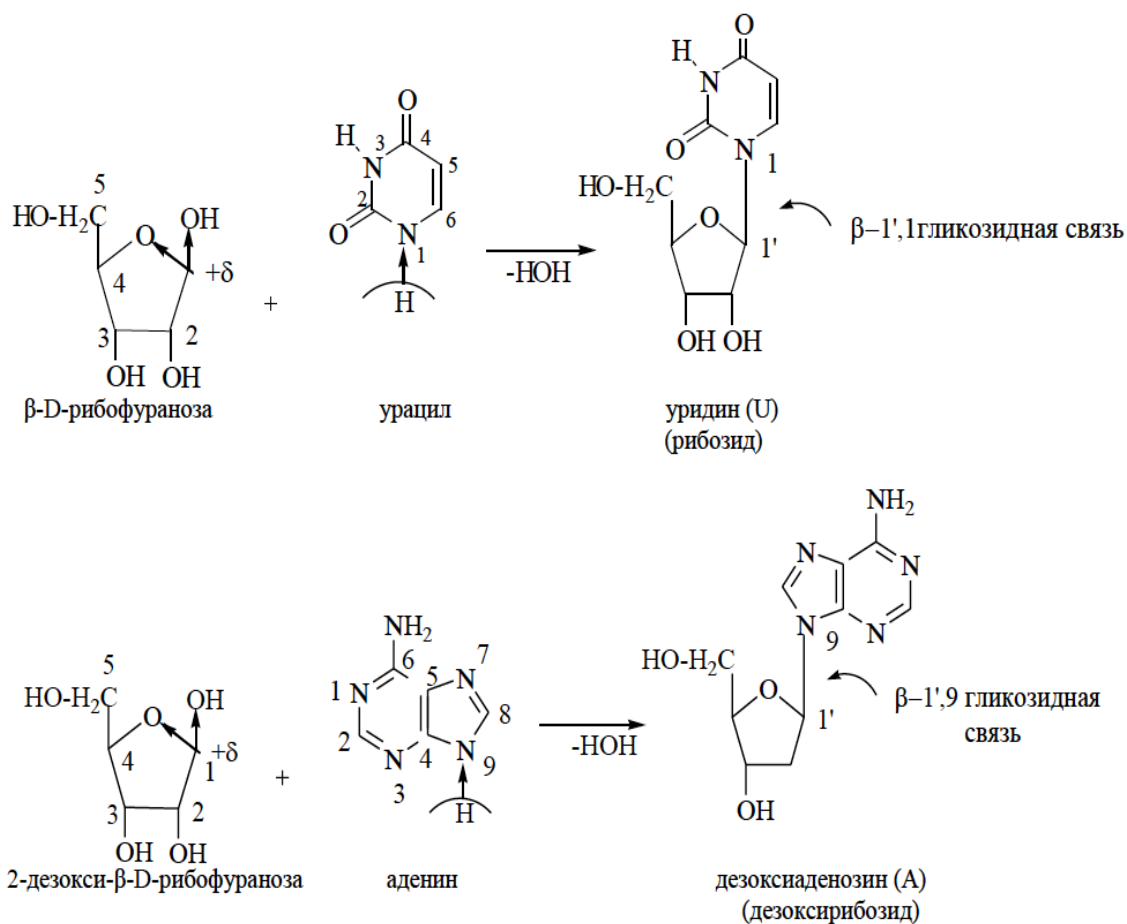


Рисунок 12 – Строение нуклеозидов

В зависимости от компонента пентозного сахара нуклеозид может быть рибонуклеозидом или дезоксирибонуклеозидом. Рибонуклеозид является нуклеозидом с рибозой сахарного компонента. В зависимости от компонента азотистого основания рибонуклеозид может быть аденозином, гуанозином, цитидином, уридином или 5-метилуридином. Дезоксирибонуклеозид является нуклеозидом с дезоксирибозой сахаром. В зависимости от компонента азотистого основания дезоксирибонуклеозид может быть дезоксиаденозином, дезоксигуанозином, дезоксицитидином, тимидином или дезоксиуридином. Кроме того, в зависимости от компонента азотистого основания нуклеозиды могут быть сгруппированы либо в пурин с «двойным кольцом», либо на пиримидин с «одним кольцом».

Таблица 1 – Номенклатура нуклеозидов

Класс нуклеозида	Азотистое основание	Название нуклеозида
Рибозиды	Урацил Цитозин Аденин Гуанин	Уридин Цитидин Аденозин Гуанозин
Дезоксирибозиды	Тимин Цитозин Адеозин Гуанин	Тимидин Дезокмицитидин Дезоксиаденизин Дезокмигуанозин

Конформации нуклеозидов. Молекулы нуклеозидов – подвижные структуры. Нуклеозиды имеют азотистое основание и пятиуглеродную углеводную группу, обычно это молекула рибозы. Остаток азотистого основания относительно условной плоскости фуранозного цикла углевода может занимать различные положения из-за возможности вращения этих структурных частей молекулы по гликозидной связи. Наиболее устойчивыми формами нуклеозидов являются конформации син- и анти-.

Пуриновые нуклеозиды. Аденозин состоит из аденина, связанного с фуранозой  $\beta$ -гликозидной связью. Кольцо аденина почти перпендикулярно кольцу фуранозы, но выступает от фуранозы (анти-конформация). Без препятствий со стороны групп на любом кольце адениновое кольцо может вращаться вокруг гликозидной связи и образовывать син-конформацию. Два общих пурина, аденин и гуанин, могут вращаться между анти- и син-конформациями, но предпочтительна антиконформация. Несмотря на то, что антиконформация поддерживается пуринами, син-конфигурация может быть сформирована и фактически играет роль в формировании Z-ДНК, конформации двойной спирали ДНК.

Пиримидиновые нуклеозиды. Если смотреть на уридин в антиконфигурации, кислород на С-2 уридина выступает от фуранозного кольца. Если смотреть на цитидин в син-конфигурации, кислород на С-2

проецируется в сторону фуранозного кольца. Этот кислород в положении С-2 создает значительные препятствия для вращения пиримидина вокруг гликозидной связи. Кислород с двойной связью с С-2 вторгается в пространство водорода у С-2' и, в меньшей степени, кислород фуранозного кольца. Поскольку оба пиримидина, обнаруженные в ДНК, имеют кислород в положении С-2, нуклеозиды и нуклеотиды этих пиримидинов принимают только антиконформацию, и они делают это даже в Z-ДНК.

Анти- и син- конформации цитидина. Плоскость основания почти перпендикулярна плоскости сахаров и приблизительно делит угол  $O4'-C1'-C2'$  пополам. Это позволяет основаниям занимать любую из двух основных ориентаций. Анти-конформер имеет меньший атом Н-6 (пиримидин) или Н-8 (пурин) над сахарным кольцом, в то время как син- конформер имеет более крупный О-2 (пиримидин) или N-3 (пурин) в этом положении. Пиримидины занимают узкий диапазон антиконформаций, тогда как пурины находятся в более широком диапазоне антиконформаций. Известен только один случай, когда пурин принимает син- конформацию. Необычная форма обнаруживается в еще более необычной структуре, а именно в левой Z-ДНК. Пример возможного взаимодействия гуанозинов в син и анти. Соответствие показано на рисунке ниже.

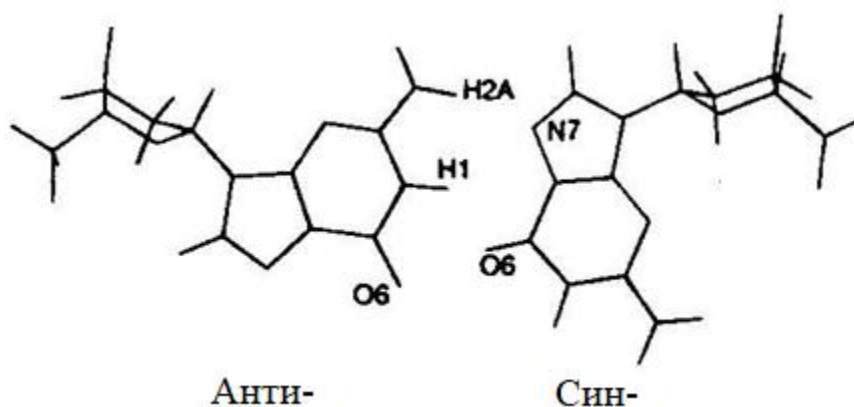


Рисунок 13 – Пример строение anti- и syn- конформации

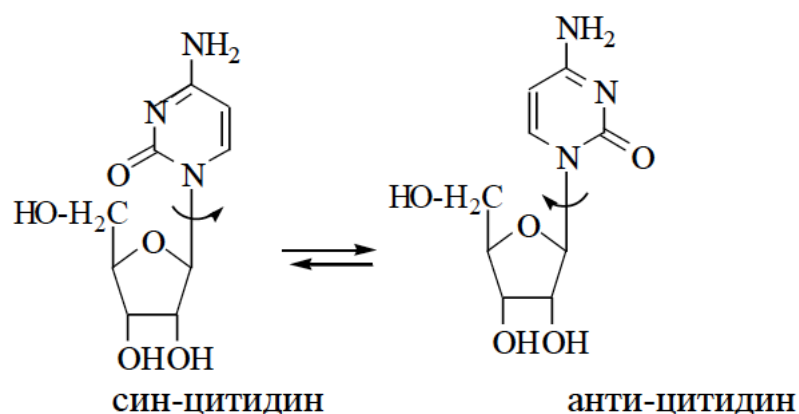
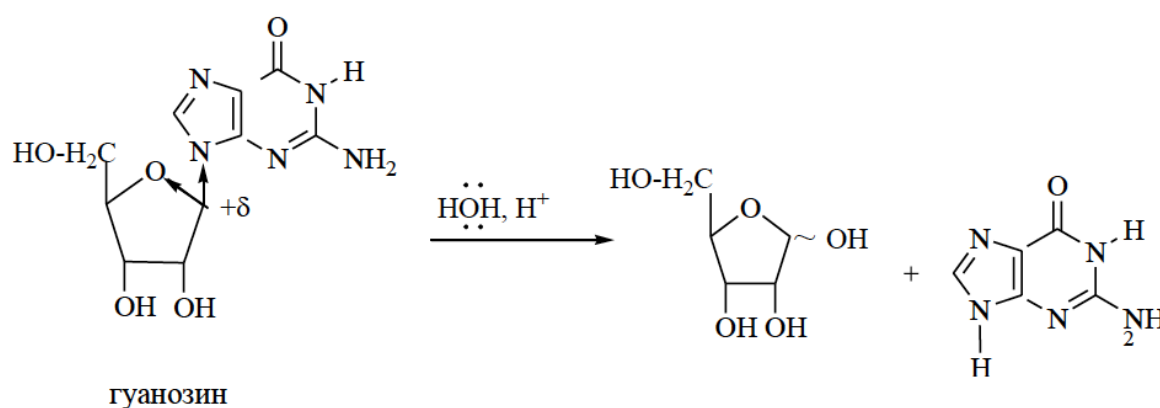


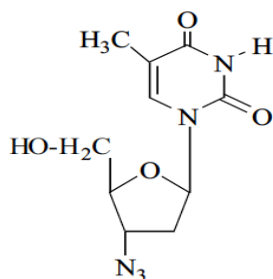
Рисунок 14 – Строение анти- и син- конформации цитидина

Гидролиз нуклеозидов – значимая для свободных нуклеозидов и метаболизма нуклеиновых кислот и реакция. Гидролитическому расщеплению подвергается гликозидная связь. Нуклеозиды гидролизуются в кислоте и стабильны в разбавленной щелочи. Гидролиз в кислоте происходит намного медленнее, чем соответствующий гидролиз O-гликозидов. Гидролиз пуриновых нуклеозидов происходит быстрее, чем гидролиз пиримидиновых нуклеозидов. При гидролизе гуанозина первой стадией является протонирование N-7 с последующим разрывом гликозидной связи и образованием иона ацилия.

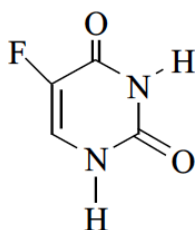
*Схема гидролиза нуклеозида.*



*Примеры лекарственных средств на основе нуклеозидов и азотистых оснований*



3'- Азидотимидин; первый противовирусный препарат из группы нуклеозидов, отмечена его эффективность при ВИЧ-инфекции.



5-Фторурацил; противоопухолевый препарат.

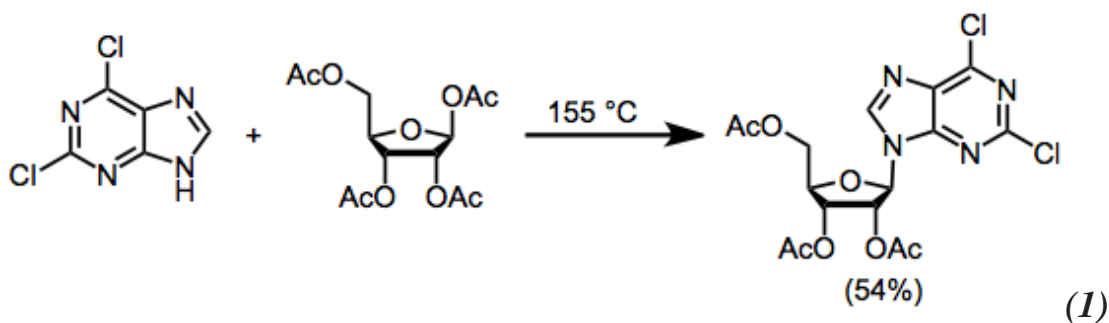
Нуклеозиды, не входящие в структуру нуклеиновых кислот, также продуцируются многими организмами. Некоторые антибиотики представляют собой нуклеозиды, которые действуют, подавляя синтез белка. Эти нуклеозиды включают кордицепин, пуромидин и цитозин арабинозид. Цитозин арабинозид эффективный препарат против миелобластного лейкоза.

Синтез нуклеозидов включает связывание нуклеофильного гетероциклического основания с электрофильным сахаром. Реакция силил-Гильберта-Джонсона (или Форбрюггена), в которой используются силилированные гетероциклические основания и электрофильные производные сахаров в присутствии кислоты Льюиса, является наиболее распространенным методом образования нуклеозидов таким образом.

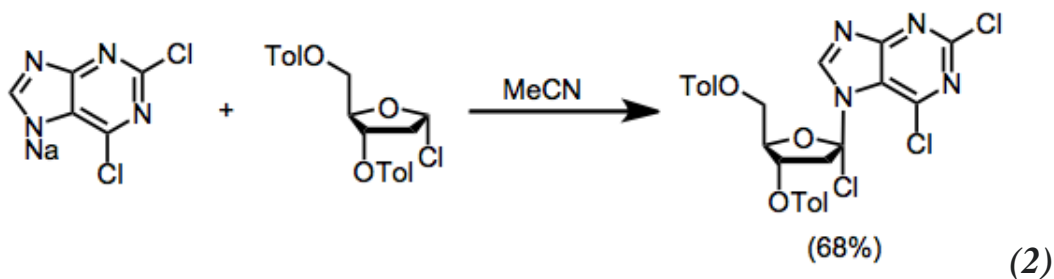
Нуклеозиды обычно синтезируются путем связывания нуклеофильного пиримидина, пурина или другого основного гетероцикла с производным рибозы или дезоксирибозы, которое является электрофильным по

аномерному углероду. Когда используется ацил-защищенная рибоза, селективное образование  $\beta$ -нуклеозида (имеющего *S*- конфигурацию у аномерного углерода) происходит в результате участия соседней группы. Стереоселективного синтеза дезоксирибонуклеозидов непосредственно из производных дезоксирибозы достичь труднее, поскольку участие соседних групп не может иметь место.

Для синтеза нуклеозидов из нуклеофильных оснований и электрофильных сахаров использовались три общих метода. Метод *слияния* включает нагревание основания и ацетил-защищенной 1-ацетоксирибозы до  $155\text{ }^{\circ}\text{C}$  и приводит к образованию нуклеозида с максимальным выходом 70%.

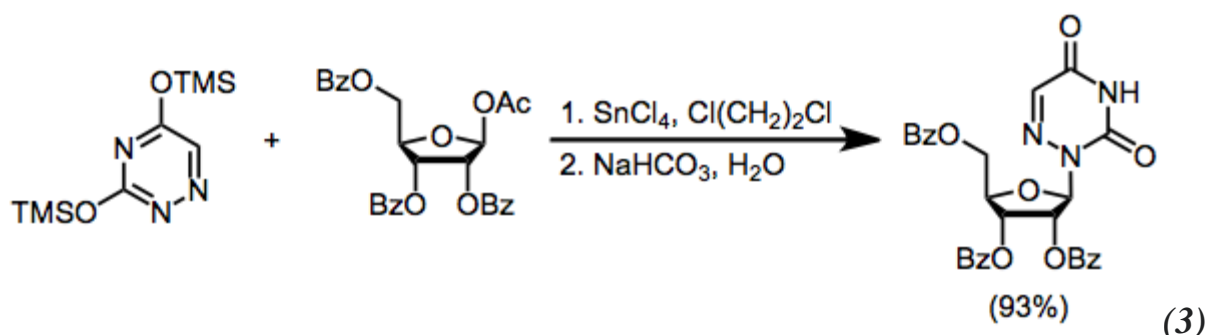


Метод с использованием *соли металла* включает комбинацию соли металла гетероцикла с защищенным галогенидом сахара. Первоначально использовались соли серебра и ртути; однако в более недавно разработанных методах используются натриевые соли.



Реакция *силл-Гильберта-Джонсона (SHJ)* (или реакция Форбрюггена), самый мягкий общий метод образования нуклеозидов, представляет собой комбинацию силилированного гетероцикла и защищенного ацетата сахара

(такого как 1-О-ацетил-2,3, 5-три-О-бензоил-бета-D-рибофураноза) в присутствии кислоты Льюиса. Избегают проблем, связанных с нерастворимостью гетероциклических оснований и их солей металлов; однако селективность по центрам иногда является проблемой, когда используются гетероциклы, содержащие несколько основных центров, поскольку реакция часто является обратимой.



### 2.2.1 Лиганд

Лиганд в химии - атом или молекула, который присоединён к центральному атому, в основном к элементу металла, в координационном или комплексном соединении (рисунок 2). Атомы и молекулы, которые используются в качестве лигандов, почти всегда являются теми, которые способны функционировать в качестве донора электронной пары в связи пары электронов (координационной ковалентной связи), образованной с атомом металла. Лиганды обычно считаются донорами электронов, притягиваемыми к металлу в центре комплекса. Металлы - акцепторы электронов. Лиганды могут быть нейтральными или отрицательно заряженными частицами с доступными электронными парами.

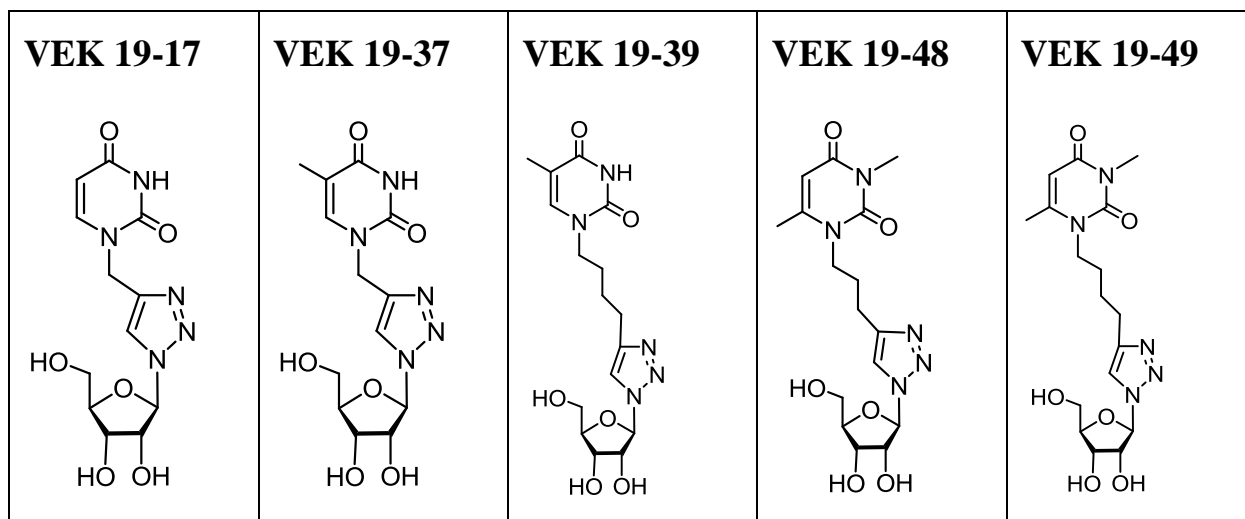


Рисунок 15 – Химическая структура использованных лигандов

Вода – обычный лиганд. Здесь показана молекула воды с двумя неподеленными парами электронов.

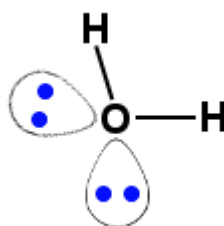
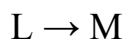


Рисунок 16 – Молекула воды с двумя неподеленными парами электронов

Электронная пара лиганда, такая как вода, обеспечивает оба электрона для связи, которая образуется между ним и центральным атомом или ионом металла.

Здесь единственный лиганд L, которым может быть вода, отдает пару электронов для образования связи с атомом металла M.



Соединение с металлом в основном использует формальную передачу одной или нескольких электронных пар лиганда, чаще всего через основания

Льюиса. Природа связи металл-лиганд может варьироваться от ковалентной до ионной. Помимо этого, последовательность связи металла – лиганд может иметь от одного до трех. Лиганды рассматриваются как основания Льюиса, но есть довольно редкие случаи с участием кислотных «лигандов» Льюиса.

*Электронное строение лигандов.* Характеристики связей переходный металл-лиганд становятся понятными при анализе молекулярных орбиталей 3d-металла, координированных шестью идентичными лигандами в октаэдрических комплексах [ML<sub>6</sub>]. В результате взаимодействия между металлом d и орбиталями лиганда образуются связывающие, несвязывающие и антисвязывающие комплексные молекулярные орбитали.

Как правило, уровни энергии орбиталей лигандов ниже, чем уровни орбиталей металлов, связывающие орбитали имеют более лигандный характер, а несвязывающие и антисвязывающие орбитали имеют более металлический характер.

*Дентальность.* Под дентальностью (также называемой дентальностью) понимается количество координационных мест, которые донорный лиганд может занимать на центральном атоме (рутении). Монодентальные (монодентатные) лиганды могут занимать только один координационный сайт центрального атома. Бидентальные (бидентатные) лиганды могут занимать два координационных участка центрального атома и трезубые (тридентатный) лиганды могут занимать три координационных участка центрального атома.

Каждый лиганд, который связывается с переходным металлом, отдает пару своих электронов металлу, разделяя эти электроны связью металл-лиганд. Подсчитать общее количество электронов в валентной оболочке металла довольно просто, если вы знаете, что каждый лиганд вносит два электрона.

Но что, если лиганд может внести более двух электронов. На рисунке 17 каждый из показанных здесь лигандов может связываться с металлом дважды. Лиганд образует две связи с металлом, отдавая две пары электронов.

Это может показаться очевидным, но образование двух связей с металлом означает, что лиганд более плотно связывается с металлом. Лиганды могут появляться и исчезать, но эти лиганды с меньшей вероятностью исчезнут; они держатся.

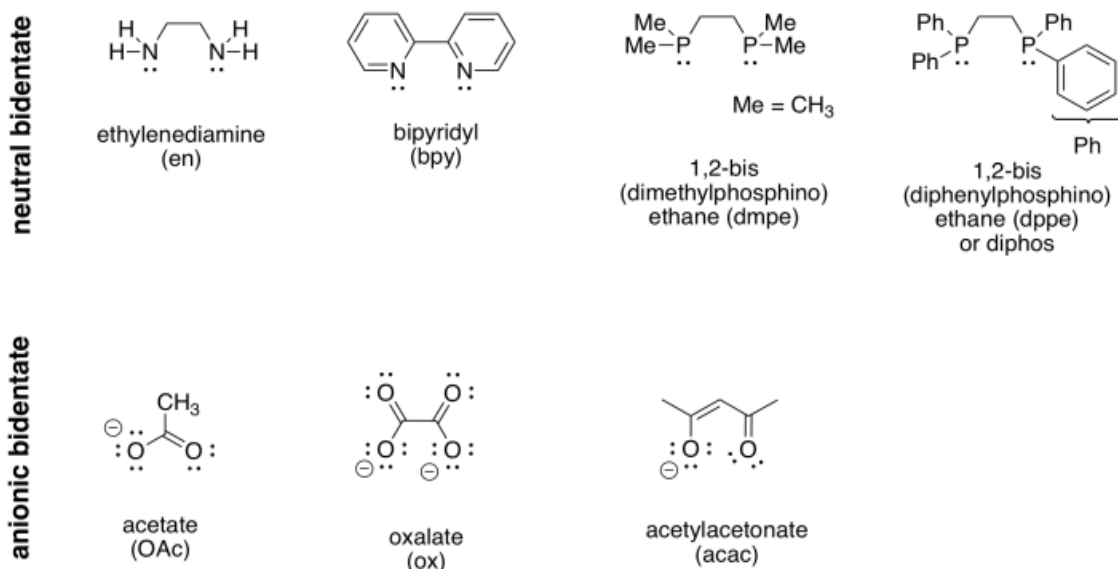


Рисунок 17 – Бидентатные лиганды

Эти лиганды называются бидентатными лигандами. Это буквально означает, что у них два зуба. Бидентатные лиганды могут врезаться в металл и удерживать его сильнее, чем монодентатные лиганды.

Другой термин, используемый для этих видов лигандов, происходит от греческого слова *chele* – коготь. Эти лиганды цепляются за металл, как клешня омара или краба; они хелатируют. Хелатный эффект – это тенденция этих лигандов прочно связываться с металлом, тогда как монодентатные лиганды могут легче отрываться.

Дентальность означает количество атомов, с которыми лиганд связывается с ионом металла. Лиганд может быть монодентатным, то есть он связывается через неподеленную пару на одном атоме. Это может быть бидентатным, то есть он связывается через одиночка пар на два различных атомах. Это может быть даже тридентатным, с тремя атомами несущих свои

собственные неподделенные пары, тетрадентатным, и так далее. Слова, полидентат и мультдентат, два общих термина для лигандов, которые связываются через более чем один атом. Слова *хелатор* и *хелатирующий лиганд* также являются общими терминами, используемыми для обозначения этих лигандов. На рисунке 18-19 показаны примеры полидентатных лигандов.

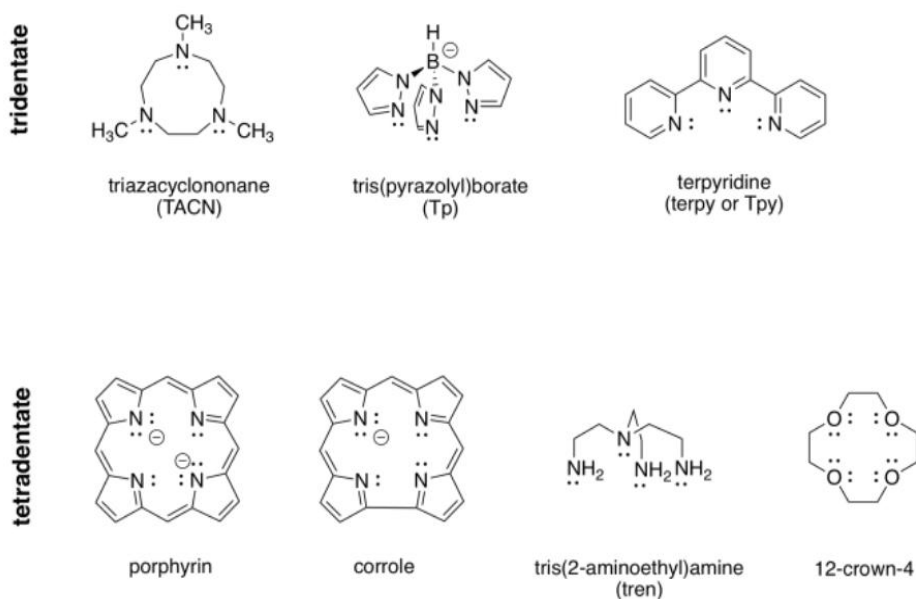


Рисунок 18 – Полидентатные лиганды

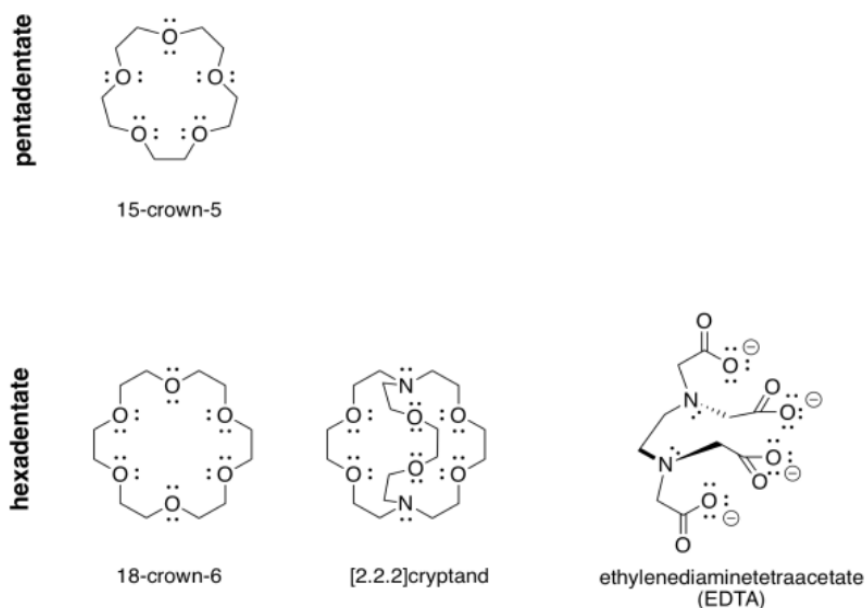


Рисунок 19 – Полидентатные лиганды

Существует символ дентальности,  $\kappa$  (греческая буква, произносимая «каппа»), который просто описывает, сколько атомов связано с металлом. Например, в этилендиаmine или 1,2-диаминоэтane,  $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$ , два атома азота могут быть связаны с металлом одновременно, хотя ни один из других атомов между ними не будет напрямую присоединен к металлу. Этот донор способен связываться в режиме  $\kappa^2$ . Однако, если по какой-то причине один из атомов азота отпускает металл, так что этилендиамин держится только на одном азоте, мы можем сказать, что лиганд связывается в режиме  $\kappa^1$ .

Координационные изомеры в полидентатных лигандах. То, что лиганд может связываться через несколько атомов, не означает, что он всегда связывается таким образом. Это часто верно в отношении ацетатного лиганда, например, потому что четырехчленное кольцо, которое образуется, когда оно связывается через оба атома кислорода, слишком напряжено. Следовательно, есть примеры связывания через оба атома кислорода, а также есть примеры связывания только через один. Иногда ацетат использует один кислород для связывания с одним атомом металла, а другой кислород - для связывания со вторым атомом металла, образуя мостик.

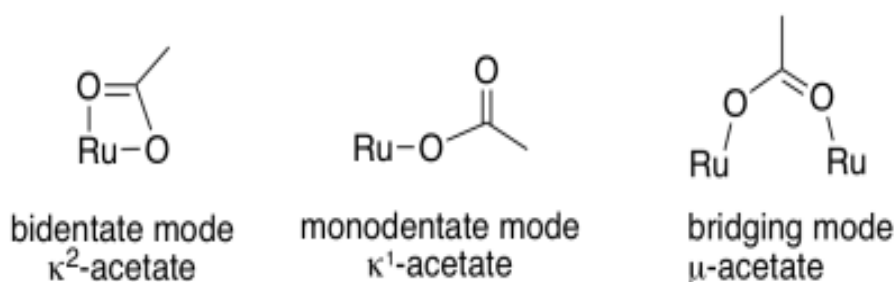


Рисунок 20 - Связывание ацетата с металлом

Обычно, если лиганд способен к хелатированию, предполагают, что он связывается таким образом. Однако могут быть случаи, когда вас просят конкретно нарисовать его привязку тем или иным способом.

### 3 Экспериментальная часть

#### 3.1 Регистрация ЯМР спектроскопии

Для получения сведений о выбранной системе, а именно о белок-лигандного взаимодействия. Исследование и регистрация  $^1\text{H}$  ЯМР спектров смеси белок-лигандного взаимодействия на ЯМР спектрометре высокого разрешения Bruker Avance III 600 МГц оборудованном трехчастотном зондом и блоком контроля температуры BCU 05 фирмы Bruker ЯМР лаборатории биофизической химии наносистем КИББ ФИЦ КазНЦ РАН. Все спектры ЯМР обрабатывали и анализировали с программой обеспечения TopSpin 3.5.

WaterLOGSY является одним из нескольких мощных методов, используемых для проверки соединений, взаимодействующих с белками. Для выполнения исследования и поставленных задач были подготовлены водные растворы смеси белка сывороточного альбумина человека и лиганда. По началу нуклеозид был растворен белком, с последующим переводением его в водный раствор, чтобы общее содержание белка, в каждом образце составляло 20 – 40 мкМ по объему. Все образцы нуклеозида и белка в диапазоне концентраций 200 ÷ 6000 мкМ растворяли в деионизированной милликвартальной воде, содержащие 10% D<sub>2</sub>O общим объемом 500 мкл.

В качестве примера приведено спектры ЯМР с помощью импульсной последовательности WaterLOGSY антибиотика цефтриаксона 800 мкМ измеренного на ЯМР спектрометре высокого разрешения Bruker Avance III 600 МГц оборудованном трехчастотном зондом и блоком контроля температуры BCU 05 фирмы Bruker ЯМР лаборатории биофизической химии наносистем КИББ ФИЦ КазНЦ РАН.

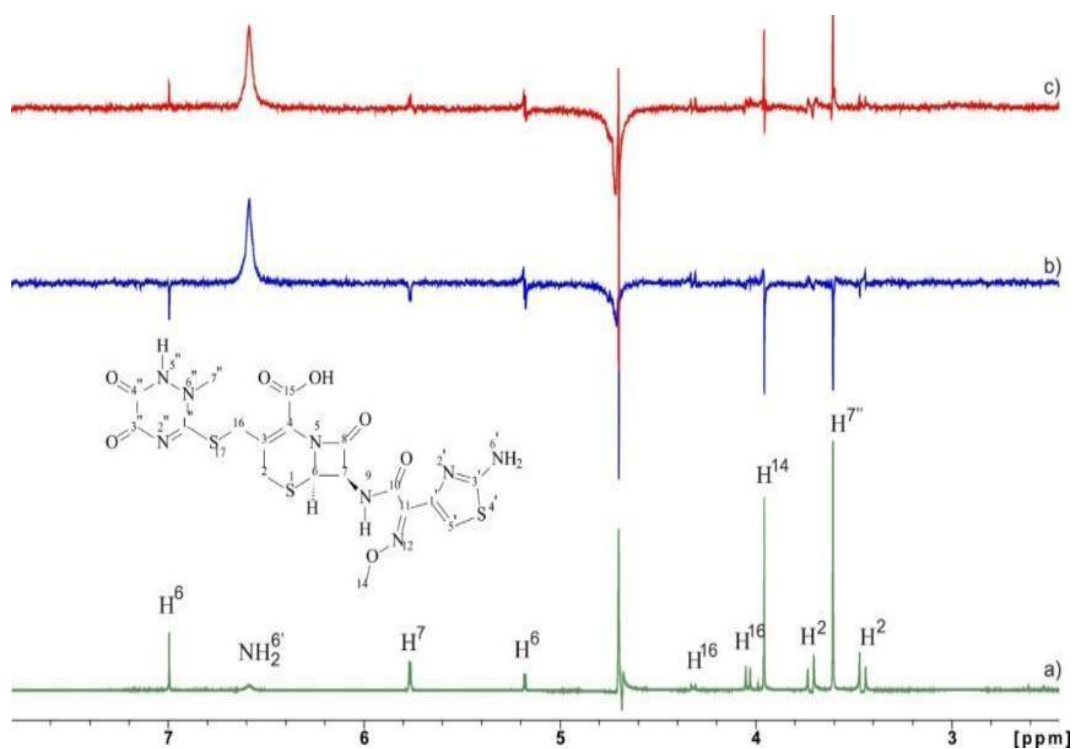


Рисунок 21 – Спектры ЯМР антибиотика цефтриаксона 800  $\mu\text{M}$ : а) спектр ЯМР  $^1\text{H}$ ; б) спектр WaterLOGSY в отсутствии белка; в) спектр WaterLOGSY цефтриаксона в присутствии 10  $\mu\text{M}$  белка. Инверсия фазы сигналов ЯМР является индикатором того, что произошло образование белок-лигандного комплекса.

Проводились измерения по обнаружению взаимодействия нуклеозидов с белком САЧ (сывороточный альбумин человека). Образцы лигандов ВЕК 19-57, -59 не титрировались, т.к. не удалось растворить в воде. Тестирование комплексообразования проводилось с помощью спектров WaterLOGSY водных растворов нуклеозидов в присутствии и отсутствии сывороточного альбумина человека. Далее на основе одним из достоинств метода WaterLOGSY которое является возможность одновременного тестирования большого количество лигандов в растворе (по литературными данными до сотни). В тестах записывались спектры WaterLOGSY растворов нуклеозидов в концентрациях 600  $\mu\text{M}$  в присутствии белка 20  $\mu\text{M}$  альбумина и его отсутствии. Ожидалось, что при наличии комплексообразования будет

происходить изменение фазы сигналов в спектрах WaterLOGSY (аналогичные как на рисунке 18). Полученные результаты приведены на рисунке 22 и рисунке 23.

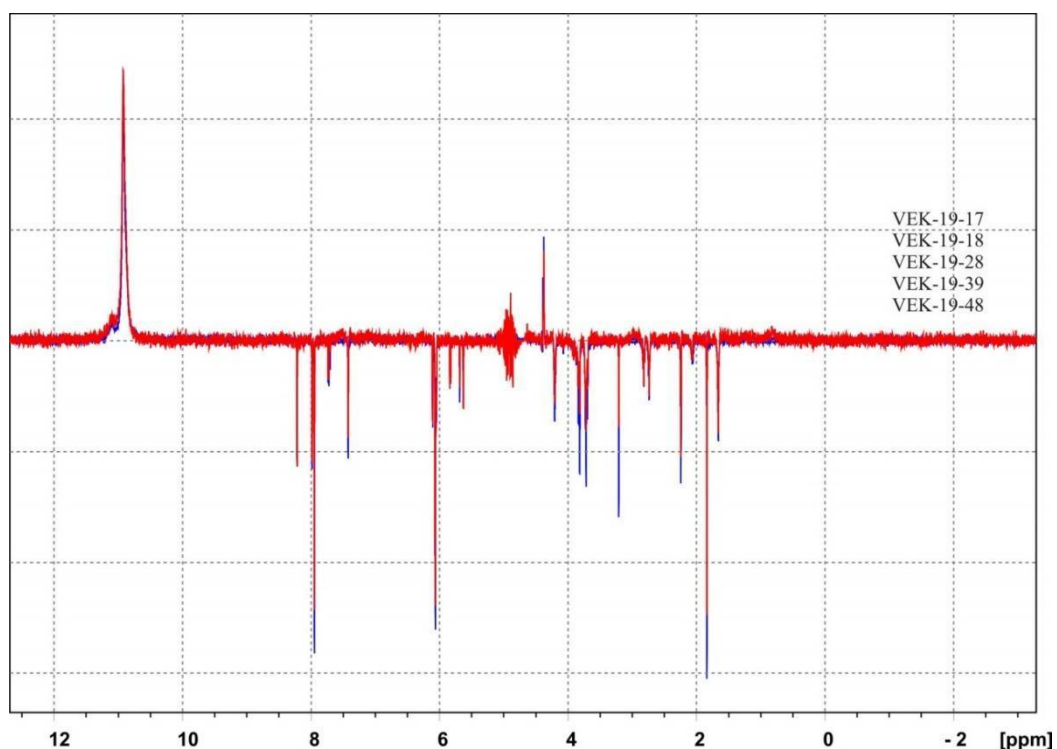


Рисунок 22 – Наложение спектров WaterLOGSY смеси нуклеозидов в отсутствии белка САЧ (синий спектр) и присутствии 20мкМ белка САЧ (красный спектр)

Видно, что большинство сигналов практически полностью совпали (с некоторым лигандами не детектируется).

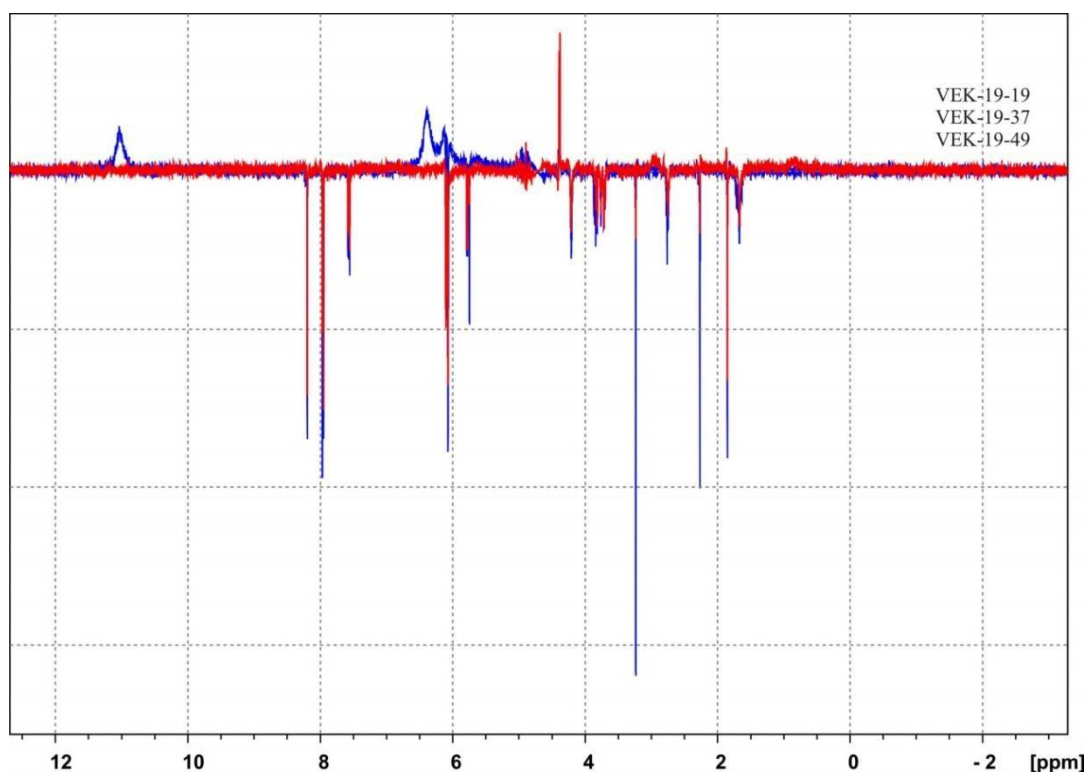


Рисунок 23 – Наложение спектров WaterLOGSY смеси нуклеозидов в отсутствии белка САЧ (синий спектр) и присутствии 20мкМ белка САЧ (красный спектр)

Видно, что для некоторых сигналов наблюдается отличие в их амплитуде при добавлении белка САЧ. Наибольшее отличие в амплитудах сигналов обнаружено для нуклеозида VEK-19-49.

Как видно, из этих рисунков инвертирование фазы сигналов ЯМР при добавлении белка альбумина в раствор с нуклеозидами не произошло. При наложении спектров на рисунке 18 сигналы практически совпали. Наблюдается лишь слабое уменьшение интенсивности сигналов ЯМР в спектре WaterLOGSY нуклеозидов VEK 19-17, -39, -48. Для нуклеозидов VEK 19-19, -37, и -49 результат представлен на Рисунке 23. Для них так же не наблюдается изменения фазы сигналов ЯМР в спектрах WaterLOGSY, но можно отметить **значимое** уменьшение интенсивности сигналов от образца VEK-19-49. Это может свидетельствовать о том, что VEK-19-49 образует комплекс с белком САЧ, но энергия комплексообразования мала.

Далее на основе исходных результатов было принято уменьшить температуру до 5°C. Для которой так же было проведена измерение импульсным последовательности методом WaterLOGSY. Для наглядности было принято записать спектр смеси нуклеозидов в отсутствии белка сывороточного альбумина человека и в присутствии 20мкМ белка САЧ (рисунке 24).

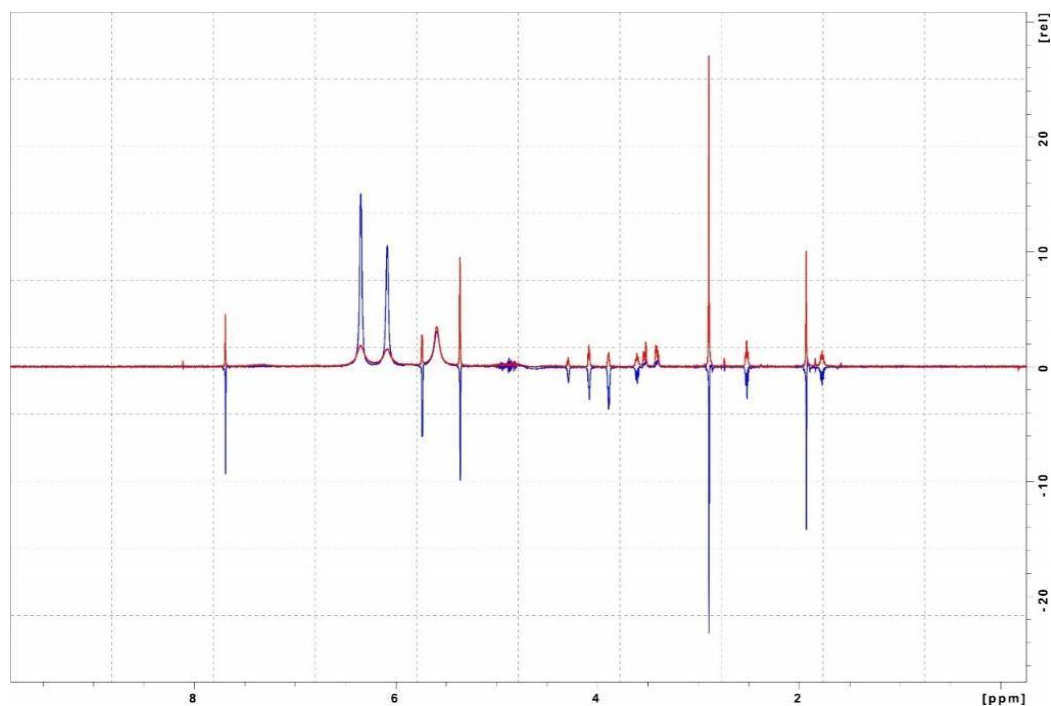


Рисунок 24 – Спектры WaterLOGSY для смеси нуклеозидов в отсутствии белка САЧ (синий спектр) и присутствии 20мкМ белка САЧ (красный спектр). Для исследования была снижена температура до  $t = 5^{\circ}\text{C}$ .

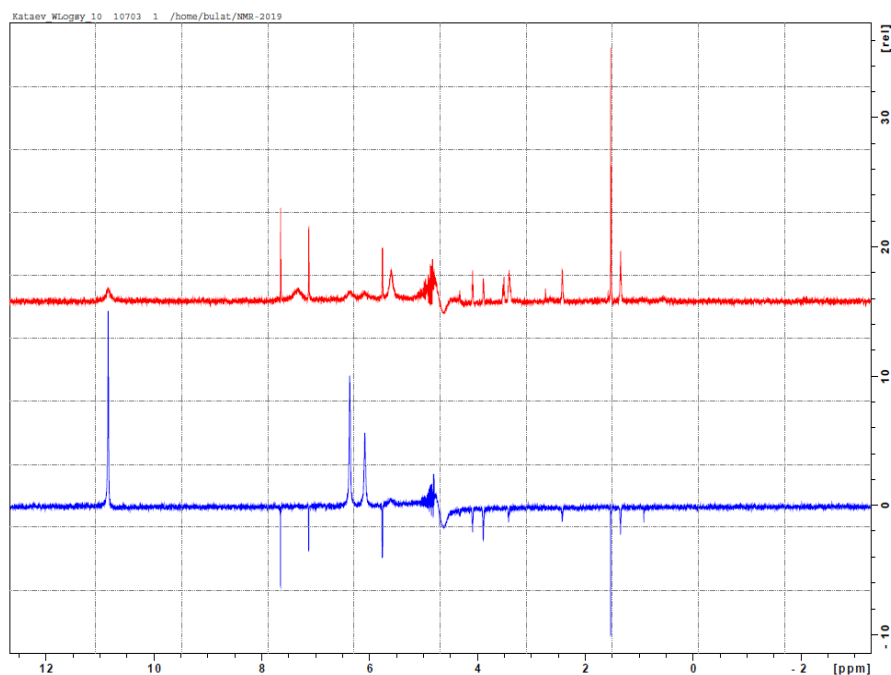


Рисунок 25 – Спектры WaterLOGSY для смеси нуклеозидов в отсутствии белка САЧ (синий спектр) и присутствии 20мкМ белка САЧ (красный спектр). Для исследования была снижена температура до  $t=5^{\circ}\text{C}$ . (VEK 19-39)

Как видно, из полученных экспериментальных данных, что для смеси нуклеозидов в присутствии 20мкМ белка сывороточного альбумина человека при температуре  $t=5^{\circ}\text{C}$  произошло изменение фазы сигналов в спектрах WaterLOGSY. Стоит отметить также, что изменение фазы в образце нуклеозидов VEK 19-39 с 20 мкМ белка САЧ свидетельствует о том, что VEK 19-39 образует комплекс с белком САЧ.

**Расчёт константы диссоциации для комплекса белок-лигандного взаимодействия.** Для расчета константы диссоциации было проведено титрование сывороточного альбумина человека раствором нуклеозидами VEK 19-17; -37; -39; -48; и -49 константа белка оставалась неизменной – 20 мкМ. Концентрация нуклеозидов варьировались в диапазоне от 200 до 6000 мкМ. Результаты измерения интегральных интенсивностей сигнала нуклеозидов с химическими сдвигами представлены в таблицах №2-6.

Таблица 2 – Экспериментальные значения интегральных интенсивностей сигнала цефтриаксона с химическим сдвигом 7.9 м.д. в различных спектрах WaterLogsy для образца VEK 19-17

Концентрация лиганда [мкМ]	Интегральная интенсивность сигнала в спектре WaterLogsy с хим.сдвигом 7.9 м.д. в системе с белком ЧСА	Интегральная интенсивность сигнала в спектре WaterLogsy с хим.сдвигом 7.9 м.д. без белка ЧСА
200	-362692,47	
400	-2036829,31	
700	-2938182,6	-14105888,38
900	-5301795,64	
1200	-7461048,37	
1500	-7990898,63	
2000	-11242919,13	-37312649,55
3000	-20709698,16	
5000	-33926739,24	-94504016,28
6000	-43761557,87	

Значение коэффициента  $\alpha$ , в случае отсутствия в смеси белка САЧ, равно – 47,2.

Таблица 3 – Экспериментальные значения интегральных интенсивностей сигнала цефтриаксона с химическим сдвигом 1.5 м.д. в различных спектрах WaterLogsy для образца VEK-19-37

Концентрация лиганда [мкМ]	Интегральная интенсивность сигнала в спектре WaterLogsy с хим.сдвигом 1.5 м.д. в системе с белком ЧСА	Интегральная интенсивность сигнала в спектре WaterLogsy с хим.сдвигом 1.5 м.д. без белка ЧСА
200	3533467,17	
400	6025821,97	
700	13900330,33	-13832914,4
900	16745172,6	
1200	21224352,97	
1500	28824733,85	
2000	34139143,49	-39427163,1
3000	49049422,66	
5000	69420627,7	-104650697
6000	84349015,65	

Значение коэффициента  $\alpha$ , в случае отсутствия в смеси белка САЧ, равно – 30,5.

Таблица 4 – Экспериментальные значения интегральных интенсивностей сигнала цефтриаксона с химическим сдвигом 7.65 м.д. в различных спектрах WaterLogsy для образца VEK 19-39

Концентрация лиганда [мкМ]	Интегральная интенсивность сигнала в спектре WaterLogsy с хим.сдвигом 7.65 м.д. в системе с белком ЧСА	Интегральная интенсивность сигнала в спектре WaterLogsy с хим.сдвигом 7.65 м.д. без белка ЧСА
200	3389849,51	-2198895,82
400	5889968,01	
700	8974568,14	-7650367,47
900	11715590,92	
1200	15163697,85	
1500	1820888469	
2000	20911681,27	-21829423,6
3000	28873753,76	
5000	38645828,65	-55368382,8
6000	40703352,7	

Значение коэффициента  $\alpha$ , в случае отсутствия в смеси белка САЧ, равно – 70,9.

Таблица 5 – Экспериментальные значения интегральных интенсивностей сигнала цефтриаксона с химическим сдвигом 1.9 м.д. в различных спектрах WaterLogsy для образца VEK 19-48

Концентрация лиганда [мкМ]	Интегральная интенсивность сигнала в спектре WaterLogsy с хим.сдвигом 1.9 м.д. в системе с белком ЧСА	Интегральная интенсивность сигнала в спектре WaterLogsy с хим.сдвигом 1.9 м.д. без белка ЧСА
200	6905803,78	-2720230,52
400	13225394,94	
700	17876642,52	-13216364,64
900	21560270,94	
1200	28480004,81	
1500	37580853,29	
2000	44870528,48	-40240202,6
3000	64369241,86	
5000	84314589,7	-77431162,73
6000	96763555,28	

Значение коэффициента  $\alpha$ , в случае отсутствия в смеси белка САЧ, равно – 63,8.

Таблица 6 – Экспериментальные значения интегральных интенсивностей сигнала цефтриаксона с химическим сдвигом 2.9 м.д. в различных спектрах WaterLogsy для образца VEK 19-49

Концентрация лиганда [мкМ]	Интегральная интенсивность сигнала в спектре WaterLogsy с хим.сдвигом 2.9 м.д. в системе с белком ЧСА	Интегральная интенсивность сигнала в спектре WaterLogsy с хим.сдвигом 2.9 м.д. без белка ЧСА
200	18696788,8	-4888023,1
400	35139602,26	
700	62075480,78	-17558131
900	77880542,49	
1200	98038027,52	
1500	126965512,7	
2000	157465170,5	-50875472
3000	205113179,3	
5000	330270067,3	
6000	384536927,6	

Значение коэффициента  $\alpha$ , в случае отсутствия в смеси белка САЧ, равно – 55,2.

Изменение интегральных интенсивностей сигналов лиганда в спектрах WaterLogsy для смеси с белком описывается уравнением 31:

$$I = \frac{-I_{max}}{1 + \left(\frac{L}{K_D}\right)} + I_{max} - \alpha L \quad (28)$$

где [L] - концентрация лиганда, в нашем случае это концентрация препаратов VEK,  $I_{max}$  – максимальное значение интегральной интенсивности сигнала лиганда,  $\alpha$  – тангенс угла наклона для зависимости изменения интегральной

интенсивности сигнала лиганда в спектрах WaterLogsy в отсутствии в растворе белка.

Далее для нахождения угла наклона для зависимости изменения интегральной интенсивности сигнала в спектрах WaterLOGSY построили линейную зависимость в программе OriginLAB-8 для каждого образца.

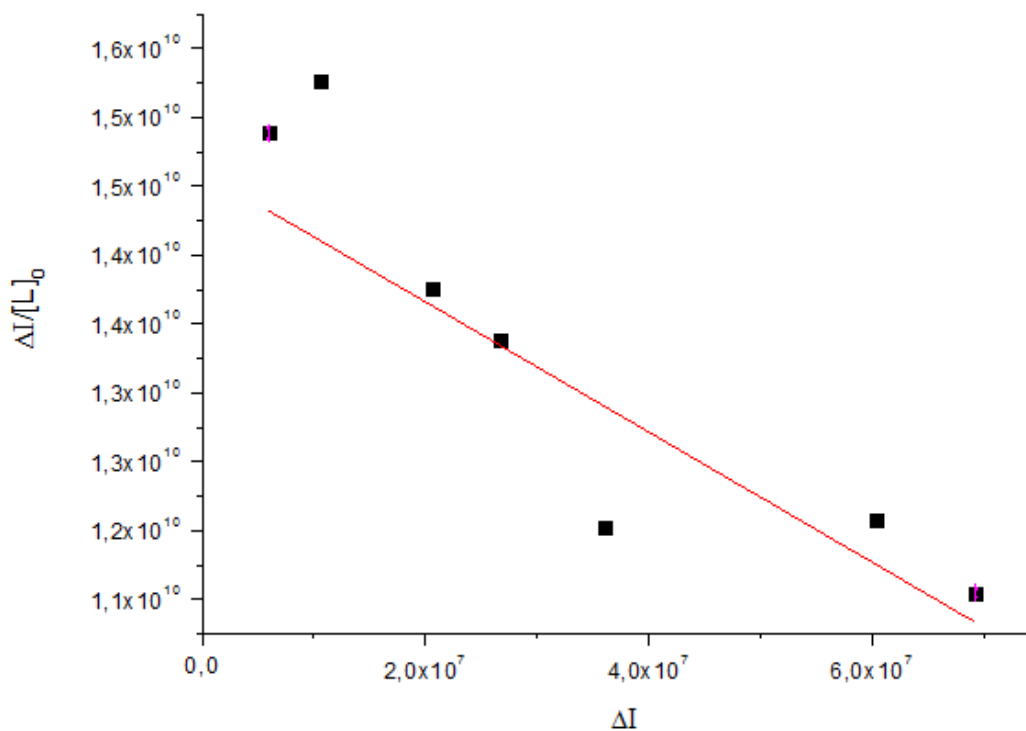


Рисунок 25 – Зависимость эффекта WaterLOGSY в координатах Скэтчерда для образца VEK 19-17

Расчет константы диссоциации  $K_d$  из угла наклона зависимости дает значение:

$$K_d = \frac{1}{\text{slope}} = (21 \pm 11) \text{ мМ} \quad (29)$$

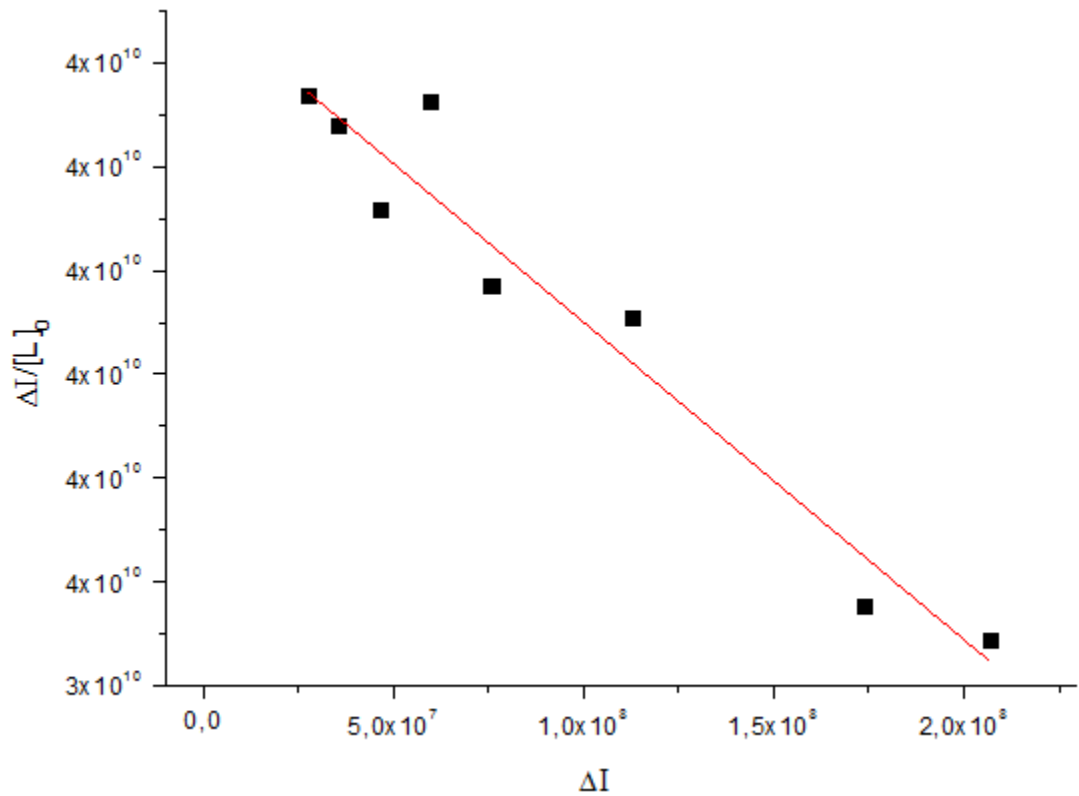


Рисунок 26 – Зависимость эффекта WaterLOGSY в координатах Скэтчерда для образца VEK 19-37

Расчет константы диссоциации  $K_d$  из угла наклона зависимости дает значение:

$$K_d = \frac{1}{\text{slope}} = (33 \pm 7) \text{ мМ}, \quad (30)$$

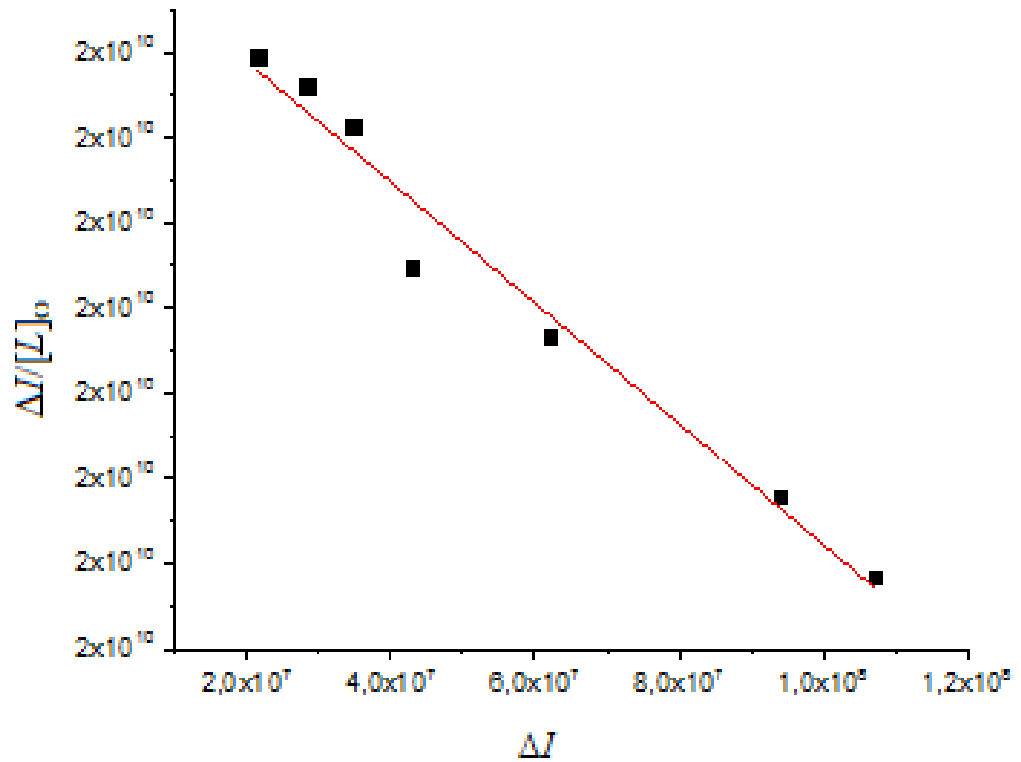


Рисунок 27 – Зависимость эффекта WaterLOGSY в координатах Скэтчерда для образца VEK 19-39

Расчет константы диссоциации  $K_d$  из угла наклона зависимости дает значение:

$$K_d = \frac{1}{slope} = (14 \pm 2) \text{ мМ}, \quad (31)$$

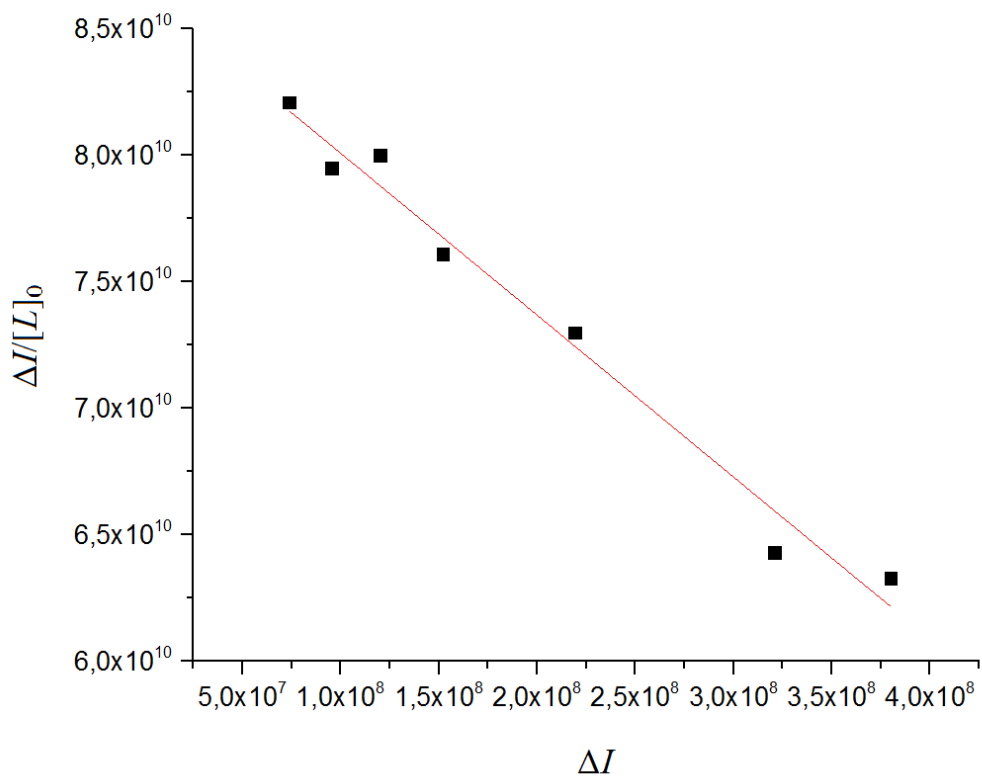


Рисунок 28 – Зависимость эффекта WaterLOGSY в координатах Скэтчерда для образца VEK 19-48

Расчет константы диссоциации  $K_d$  из угла наклона зависимости дает значение:

$$K_d = \frac{1}{\text{slope}} = (16 \pm 2) \text{ мМ}, \quad (32)$$

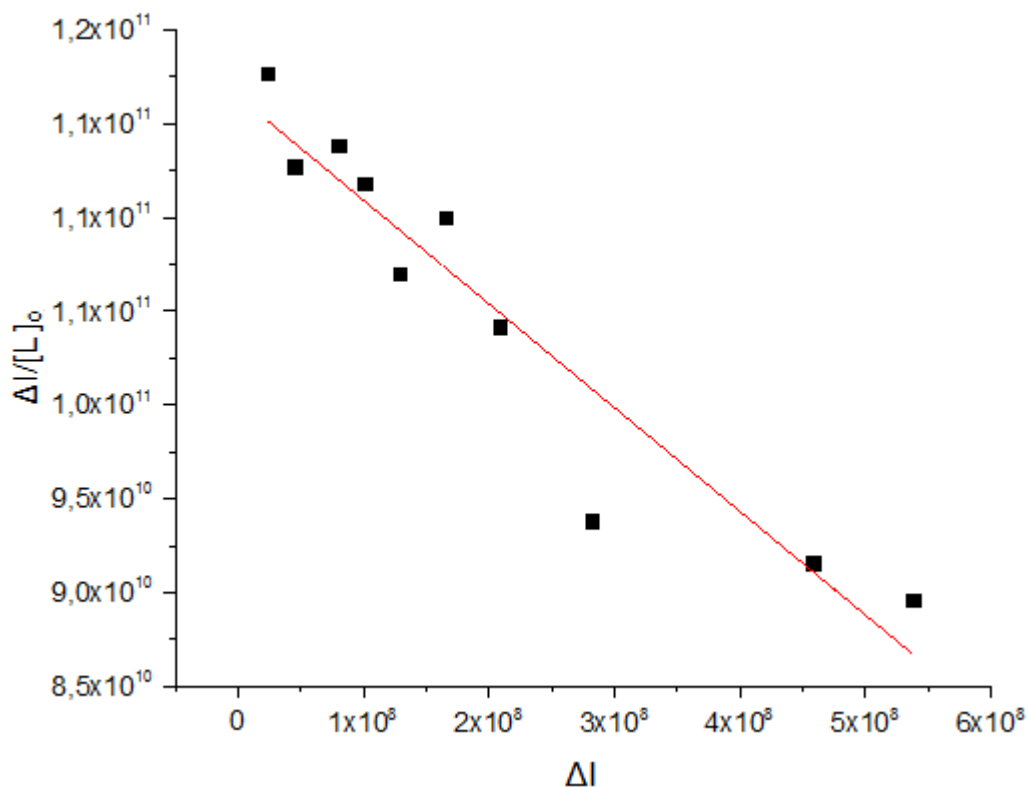


Рисунок 29 – Зависимость эффекта WaterLOGSY в координатах Скэтчерда для образца VEK 19-49

Расчет константы диссоциации  $K_d$  из угла наклона зависимости дает значение:

$$K_d = \frac{1}{\text{slope}} = (18 \pm 4) \text{ мМ.} \quad (33)$$

### 3.2 Результаты молекулярного докинга

Для сравнения с экспериментальными данными ЯМР спектроскопии и теоретическими результатами молекулярного докинга, был использован программный пакет AutoDock. Он позволяет определить энергию взаимодействия.

В данной работе исследовалось взаимодействие белок-лигандного комплекса, на примере нуклеозидов с сывороточным альбумином человека. Для работы был использован программный пакет AutoDock Tools,

позволяющий реализовать метод молекулярного докинга с целью поиска локального минимума энергии взаимодействия (связи) между лигандом и белком, а также проводить поиск глобального минимума энергии связи между лигандом и белком.

Для определения энергии связывания методом молекулярного докинга были использованы трехмерные модели структур лигандов: VEK 19-17; -37; -39; -48; и -49; а также образец сывороточного альбумина человека взятые из международных банков данных Protein Data Bank <https://www.rcsb.org>, DrugBank <https://www.drugbank.ca/drugs/DB01212>. Известно, что у сывороточного альбумина человека имеется два основных центра связывания, молекулярный докинг был выполнен для один из центров связывания.

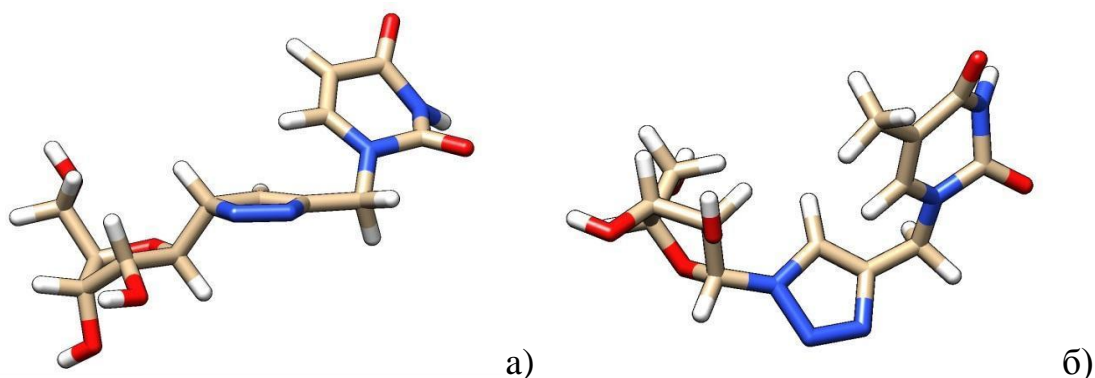


Рисунок 30 – Структура лиганда: а) трехмерная структура лиганда VEK 19-17; б) трехмерная структура лиганда VEK 19-37

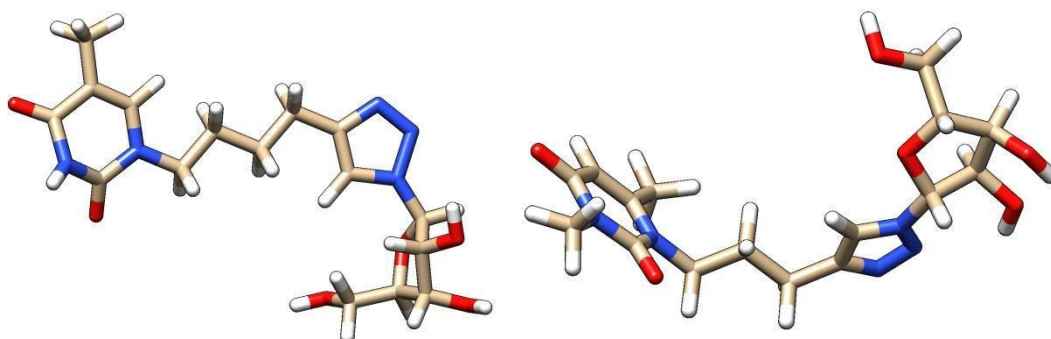


Рисунок 31 – Структура лиганда: а) трехмерная структура лиганда VEK 19-39; б) трехмерная структура лиганда VEK 19-48

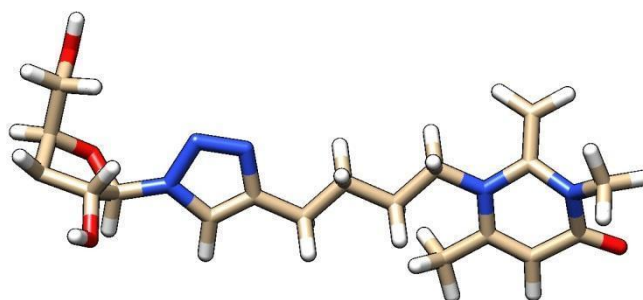


Рисунок 32 – Трехмерная структура лиганда VEK 19-49

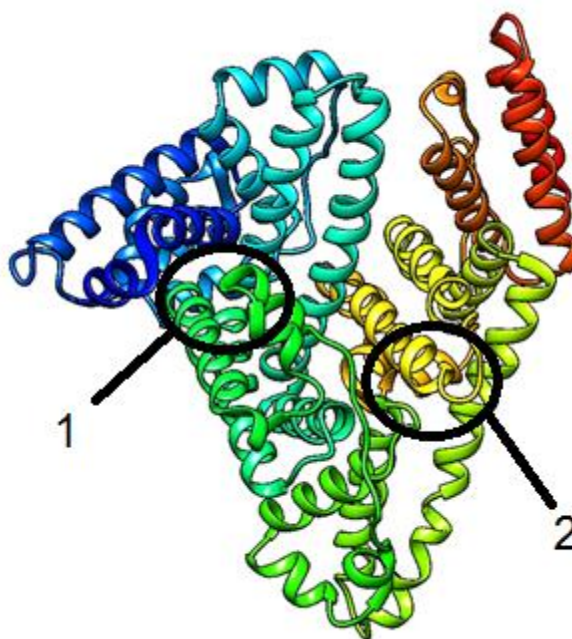


Рисунок 33 - Трехмерная структура белка сывороточного альбумина человека с выделенными двумя центрами связываниями

### **3.2.1 Взаимодействие нуклеозидов с сывороточным альбумином человека**

Молекулярный докинг проводится в кубической области внутри рецептора (docking box). Лиганды помимо совокупности атомов, связей и зарядов, внутри autodock описывается набором чисел — положением в docking box, поворотом всех активных торсионных углов. Autodock оптимальным образом перебирает все возможные комбинации этих чисел,

чтобы в итоге найти самое оптимальное с точки зрения энергии взаимодействия с рецептором положение лиганда в docking box.

Для этого была построена кубическая область — слепой докинг, захватывающий всю область белка (САЧ), чтобы посмотреть в какой центр связывания лиганд садится. Таким образом, был получен результат молекулярного докинга для всех образцов (рисунок 33-38).

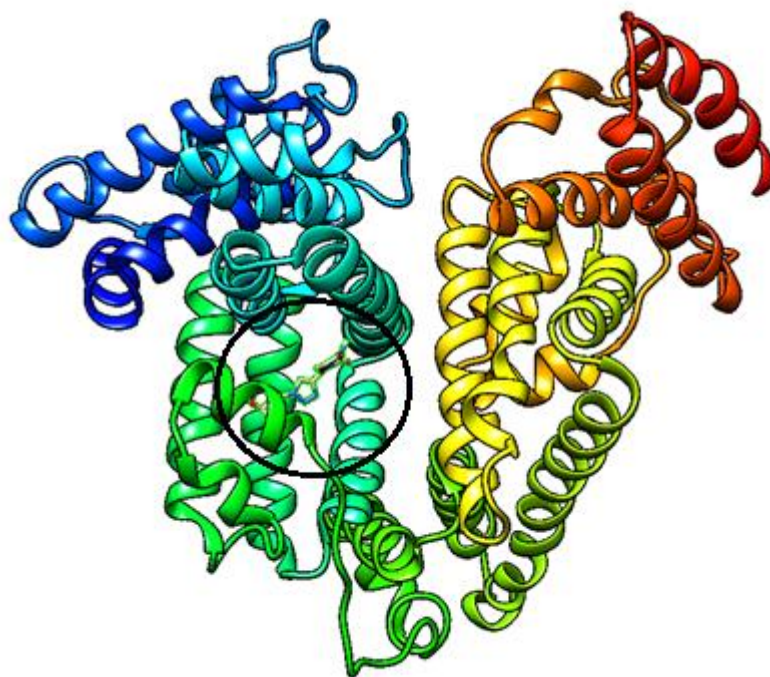


Рисунок 34 – Результат молекулярного докинга при взаимодействии нуклеозида VEK 19-17 с САЧ (n=100)

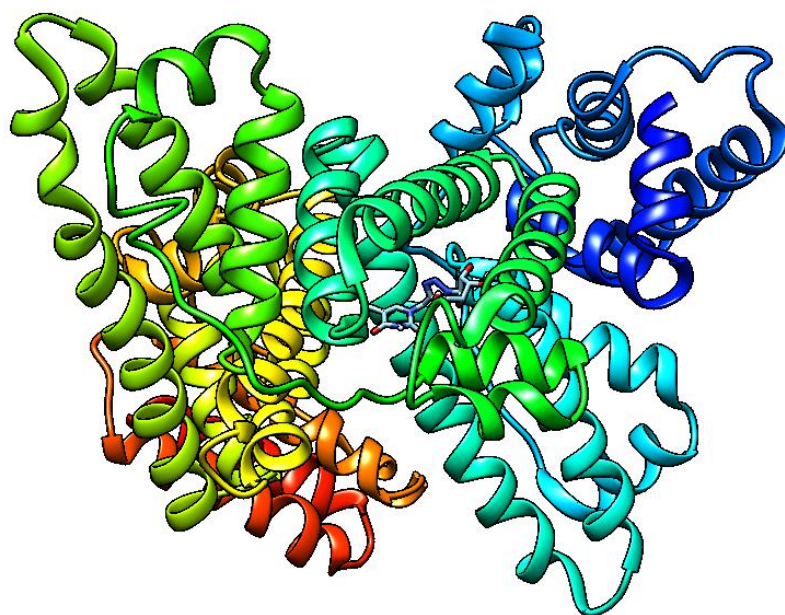


Рисунок 35 – Результат молекулярного докинга при взаимодействии нуклеозида VEK 19-37 с САЧ (n=100)

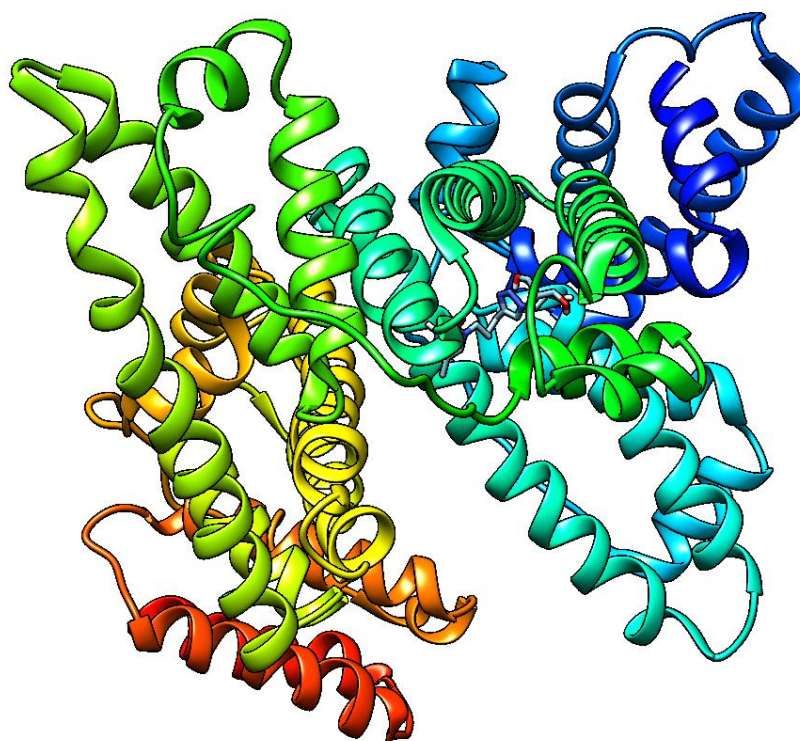


Рисунок 36 – Результат молекулярного докинга при взаимодействии нуклеозида VEK 19-39 с САЧ (n=100)

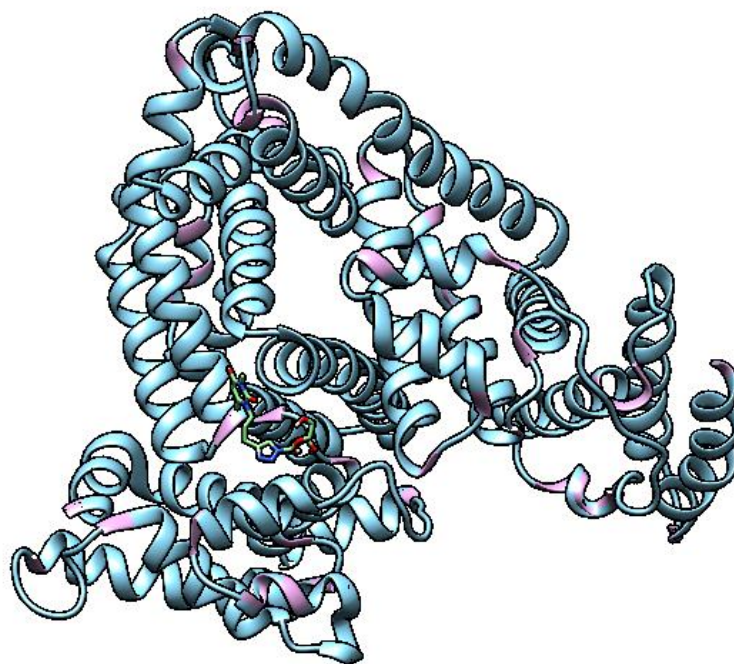


Рисунок 37 – Результат молекулярного докинга при взаимодействии нуклеозида VEK 19-48 с САЧ (n=100)

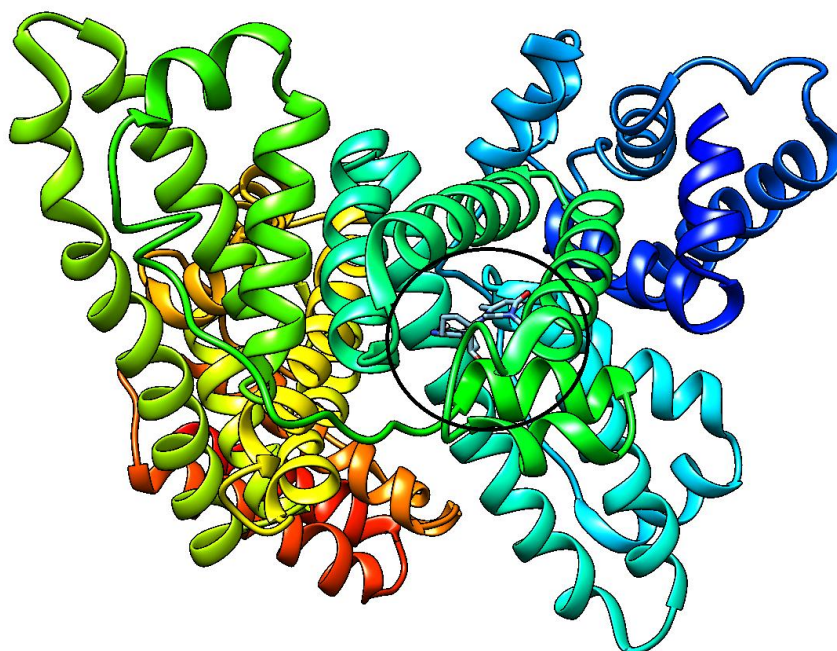


Рисунок 38 – Результат молекулярного докинга при взаимодействии нуклеозида VEK 19-48 с САЧ (n=100)

В результате получили пространственное распределение энергии взаимодействия лиганда с белком. Так как лиганд может садиться в любой удобный карман для дальнейшего изучения докинг выполнялся для одного из двух центров связывания. Так как по литературными данными второй центр связывания взаимодействует с лигандом но энергия взаимодействия лиганда очень слабое.

Молекулярный докинг для I центра связывания. Стыковка нуклеозидов осуществлялась для одного из двух центров связывания. Тип расчетов был выполнен для первого центра связывания САЧ (I центр связывания). Для центра кубическая область (docking box) была одинакова с точками 60x60x60 и расстоянием между точками сетки 0,375Å. Кубическая область была построена с помощью программы AutoGrid. Определенные сетки были созданы для каждого типа атомов лиганда. Каждое вычисление стыковки состояло из 100 независимых прогонов. В конце процедуры стыковки был выполнен кластерный анализ. Конформации с наивысшим рейтингом были выбраны в качестве лучших конформаций. Свободная энергия связи и константа диссоциации были оценены как средние по всем полученным комплексам.

Результаты. Молекулярная стыковка была использована для изучения взаимодействия нуклеозидов с человеческим сывороточным альбумином, для анализа структуры комплексов и оценки энергии связи. Пространственное распределение нуклеозидов в обоих сайтах связывания белка показано на рисунке 33.

Согласно нашим расчетам, ван-дер-ваальсовы взаимодействия и энергия десольватации дают основной вклад в расчетную энергию свободной связи. Электростатические взаимодействия дают небольшой благоприятный вклад, а изменение энтропии конфигурации в результате связывания дает небольшой неблагоприятный вклад в энергию свободной связи. Обычно лиганды связываются с двумя областями сывороточного альбумина с

различным сродством. Кластерный анализ был выполнен для I-го сайта. Для анализа использовались наиболее населенные кластеры с наименьшей энергетической конформацией. На рисунке 39 показана локализация нуклеозидов на участке I.

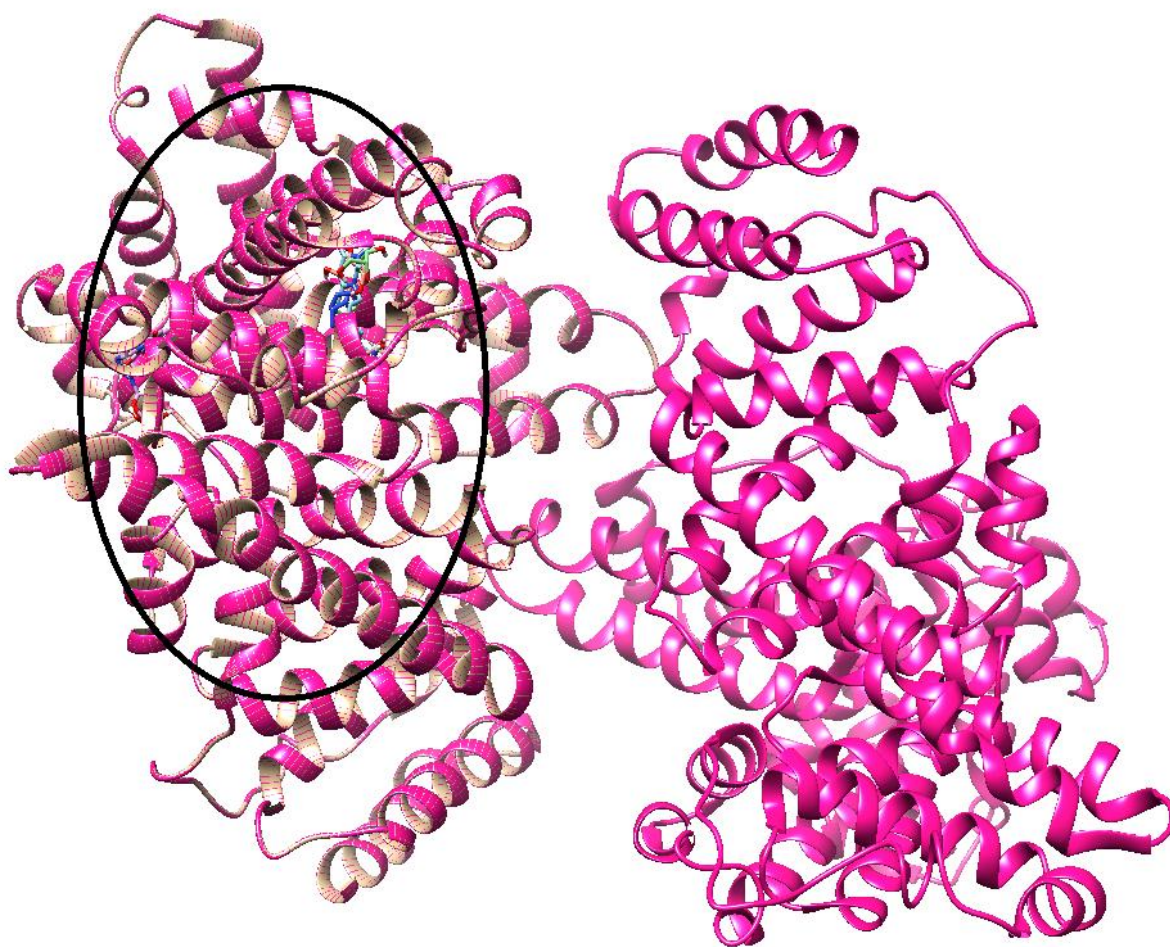


Рисунок 39 – Молекулярный докинг для центра I центра связывания

На участке I нуклеозиды образуют стабильные комплексы с альбумином со средней энергией связи  $-6,38$ , что немного больше, чем значения, полученные в экспериментах WaterLOGSY.

С помощью метода WaterLOGSY измерена константа диссоциации для комплексов. Из исследованных нуклеозидов наиболее прочно связывается с альбумином (см. Таблица №7).

Таблица 7 – Результаты ЯМР спектроскопии и молекулярного докинга

	Экспериментальные значения полученные методом WaterLOGSY	значения методом	Теоретически рассчитанные методом молекулярного докинга
Лиганд	Константа диссоциации Kd [мМ]	Энергия связывания $\Delta G$ [кДж/моль]	Энергия связывания $\Delta G$ [кДж/моль] I центр связывания
VEK 19-17 – САЧ	21±11	-2,1	-6,49
VEK 19-37 – САЧ	33±7	-1,9	-6,23
VEK 19-39 – САЧ	14±2	-2,4	-5,88
VEK 19-48 – САЧ	16±2	-2,3	-6,85
VEK 19-49 – САЧ	18±4	-2,2	-6,44

В наиболее энергетически выгодном комплексе нуклеозиды взаимодействуют с лигандом VEK 19-48. Наименьшую энергию связывания с сывороточным альбумином человека из исследуемых лигандов продемонстрировал лиганд VEK 19-37.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Методами спектроскопии ЯМР доказано образование белок-лигандный комплекс нуклеозидов с сывороточным альбумином человека. С помощью метода WaterLOGSY измерена константа диссоциации для комплексов. Из исследованных нуклеозидов наиболее прочно связывается с альбумином (см. Таблица №7). Энергия связывания нуклеозида VEK 19-37 на -0,5 кДж меньше чем для VEK 19-39. Нуклеозид VEK 19-37 продемонстрировал наименьшую энергию связывания с САЧ из исследованных лигандов.

Так как ЯМР спектроскопия не дает прямой экспериментальной информации о структуре комплекса, был применен метод компьютерного моделирования для построения модели комплекса лиганда с белком на основе программы AutoDock. Методом молекулярного докинга получены трехмерные модели структур комплексов нуклеозидов с сывороточным альбумином человека и вычислены энергии образования этих комплексов. На основании полученных моделей выполнен анализ аминокислотных остатков играющих ключевую роль в образовании комплексов.

## ВЫВОДЫ

1. Экспериментально методом WaterLOGSY показано, что лиганды нуклеозидов образуют комплексы с человеческим сывороточным альбумином. Измерена константа диссоциации для этих комплексов.

2. Молекулярный докинг продемонстрировал, что выбранные нуклеозиды образуют стабильные комплексы с человеческим сывороточным альбумином. Предпочтительное место связывания с человеческим сывороточным альбумином определен как I центр связывания (субдомен ПА).

3. Энергии образования комплексов по данным метода WaterLOGSY и молекулярного докинга качественно согласуются друг с другом за исключением лиганда VEK-19-37.

## Научная деятельность

### *Доклады на конференциях:*

1. **Бердиев, Р. Ш.** Исследование образования комплекса сывороточного альбумина человека с лигандами методом ЯМР спектроскопии // Итоговая научно-образовательная конференция студентов, Институт Физики КФУ, 14.04.2021.

2. **Бердиев, Р. Ш.** ЯМР спектроскопия в исследовании белок-лигандного взаимодействия с сывороточным альбумином человека // 95-я Международная студенческая научно-практическая конференция, КГМУ 15.04.2021, устный доклад (3-е место).

### *Публикации:*

1. **Бердиев, Р. Ш.** ЯМР спектроскопия в исследовании белок-лигандного взаимодействия с сывороточным альбумином человека / Р. Ш. Бердиев, Б. И. Хайрутдинов – Текст : непосредственный // Сборник тезисов 95-й Международной студенческой научно-практической конференции, КГМУ – 2021 (в печати).

2. **Бердиев Р. Ш.** Исследование образования комплекса сывороточного альбумина человека с лигандами методом ЯМР спектроскопии / Итоговая научно-образовательная конференция студентов Казанского Федерального Университета 2021 года: сб.тезисов. Казань: Изд-во Казан.Ун-та (в печати).

## **Благодарность**

*Выражаю благодарность своему научному руководителю Хайрутдинову Булату Имамутдиновичу за помощь на всех этапах выполнения дипломной работы.*

*Так же благодарю своего научного консультанта Елену Андреевну за советы и помощь в написании дипломной работы.*

*Хочу поблагодарить сотрудников лаборатории биофизической химии наносистем Казанского института биохимии и биофизики ФИЦ КазНЦ РАН за помощь и поддержку при выполнении работы.*

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

- 1 Абрагам, А. Ядерный магнетизм : учебник / А. Абрагам; перевод с англ. под ред. Г.В. Скроцкого. – М.: Изд-во иностр. лит-ры. - 1963. – 552 с. – Текст : непосредственный.
- 2 Фарар, Т. С. Импульсная и Фурье-спектроскопия ЯМР: учебник/ Т. С. Фарар, Э. Д. Беккер; перевод с англ. под ред. Э. П. Федина.– М.: Мир. –1973. – 164 с. – Текст : непосредственный.
- 3 Сорванов, А. А. Выпускная квалификационная работа (магистратура): ЯМР спектроскопия биологически активных карбамидсодержащих соединений / А. А. Сорванов. – Томск: Изд-во НИ ТГУ, 2017. – 65 с. – Текст : электронный // Электронная библиотека НИ ТГУ. – URL: <http://vital.lib.tsu.ru> (дата обращения: 12.05.2021). – Режим доступа: для авторизир. пользователей.
- 4 Игнатъев, Ю. А. Факторы, определяющие химические сдвиги в Спектрах ЯМР высокого разрешения : учебник / Ю. А. Игнатъев, Б. В. Семаков, П. М. Бородин. – Москва : Юрайт, 2019. – 45 с. – Текст : непосредственный.
- 5 Данилова, А.Г. Выпускная квалификационная работа (магистратура) : ЯМР в исследовании белок лигандного взаимодействия для разработки терапевтических препаратов / А.Г. Данилова. – КФУ, Казань. – 2019. – 94 с.
- 6 Overhauser, A. W. Polarization of Nuclei in Metals / A. W. Overhauser. – Текст : непосредственный // Physical Review – 1953. –Vol. 92, N 2. – P. 411–415.
- 7 Нифантьев, И. Э. Практический курс спектроскопии ядерного магнитного резонанса : учебно-методическое пособие / И. Э. Нифантьев, П. В. Ивченко ; Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова. Текст : непосредственный.– Москва : МГУ, – 2006. – 200 с. – Текст : непосредственный.

- 8 Noggle, J. H. The Nuclear Overhauser Effect / J. H. Noggle, R. E. Schirmer. – Текст : непосредственный // Chemical Applications, Academic Press. – 1972, N 10. – P. 76–80.
- 9 Longitudinal two-spin order in 2D exchange spectroscopy (NOESY) / G. Bodenhausen, G. Wagner, M. Rance [et al.]. – Текст : непосредственный // J. Magn. Reson. – 1984. – Vol. 59, N 3. – P. 542–550.
- 10 Feeney, J. The effects of intermediate exchange processes on the estimation of equilibrium constants by NMR / J. Feeney, Batchelor, G., Albrand, J. P. and Roberts. – Текст : непосредственный // G.C.K. J. Magn. Reson. – 1979, – Vol. 33. - P. 519–529.
- 11 Shuker, S. B. Discovering High-Affinity Ligands for Proteins: SAR by NMR / S. B. Shuker, P. J. Hajduk, R. P. Meadows, S. W. Fesik. – Текст : непосредственный // Science. – 1996. – N 274. – P. 1531–1534.
- 12 Hajduk, P. J. Discovery of potent nonpeptide inhibitors of stromelysin using SAR by NMR / P.J. Hajduk, D.G. Sheppard, D.G. Nettlesheim. – Текст : непосредственный // Am. Chem. Soc. – 1997. – N 119. – P. 5818–5827.
- 13 Hajduk, P. J. One-dimensional relaxation-and diffusion-edited NMR methods for screening compounds that bind to macromolecules / P. J. Hajduk, Olejniczak, E. T., Fesik, S. W. – Текст : непосредственный // J. Am. Chem. Soc. – 1997, N 119. – P. 12257–12261.
- 14 Meyer, B. Screening mixtures for biological activity by NMR / T. Weimar, T. Peters. – Текст : непосредственный // Eur. J. Biochem. – 1997, N 246. – P. 705–709.
- 15 Chen, A. NOE pumping: a novel NMR technique for identification of compounds with binding affinity to macromolecules / A. Chen, M. J. Shapiro, – Текст : непосредственный // J. Am. Chem. Soc., – 1998, N 120. – P. 10258–10259.

16 Stockman, B. J. NMR spectroscopy as a tool for structure-based drug design / B. J. Stockman. – Текст : непосредственный // *Progr. Nucl. Magn. Res. Spect.*, – 1998, N 33. – P. 109–151.

17 Protein -ligand binding affinity determination by the waterLOGSY method: An optimised approach considering ligand rebinding / D. W. Timothy, H. Renjie, A. Bonnichon [et al.]. – Текст : непосредственный // *Scientific*. – 2017. – N 75. – P. 35–40.

18 Dalvit, C. Identification of compounds with binding affinity to proteins via magnetization transfer from bulk water / C. Dalvit. – Текст : непосредственный // *J. Biomol. NMR*. – 2000. – Vol.18. – P. 65–68.

19 Time efficient detection of protein–ligand interactions with the polarization optimized PO-WaterLOGSY NMR experiment / A. D. Gossert, H. Christelle, J. J. Blomers [et al.]. – Текст : непосредственный // *J. Biomol. NMR*. – 2009. – Vol.43. – P. 211–217.

20 Molecular Docking and Structure-Based Drug Design Strategies / L. G. Ferreira, N. Ricardo dos Santos, O. Glaucius [et al.]. – Текст : непосредственный // *Molecules*. – 2015. – Vol. 20. – P. 13384–13421.

21 Молекулярный докинг: роль невалентных взаимодействий в образовании комплексов белков с нуклеотидами и пептидами / Т. В. Пырков, И. В. Озеров, Е. Д. Балицкая [и др.]. – Текст : непосредственный // *Биоорганическая химия*. – 2010. – Т. 36, № 4. – С. 482–492.

22 Mezei, M. A new method for mapping macromolecular topography / M. Mezei. – Текст : непосредственный // *J. Mol. Graph. Model*. – 2002. – Vol.21. – P. 463–472.

23 Koshland, D. E. Correlation of structure and function in enzyme action / D. E. Koshland. – Текст : непосредственный // *Science*. – 1963. – Vol.142. – P. 1533–1541.

24 Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and empirical binding free energy function / G. M. Morris, D.S . Goodsell, R. S.

Halliday [et al.]. – Текст : непосредственный // J. Comput. Chem. – 1998. – Vol.19. – P.1639–1662.

25 AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility / G. M. Morris, R. Huey, W. Lindstrom [et al.]. – Текст : непосредственный // J. Comput. Chem. – 2009. – Vol. 30. – P. 2785–2791.

26 A semiempirical free energy force field with charge-based desolvation / R. Huey, G. M. Morris, A. J. Olson [et al.]. – Текст : непосредственный // J. Comput. Chem. – 2007. – Vol. 28. – P.1145–1152.

27 Sanner, M. F. Python: a programming language for software integration and development / M. F. Sanner, M. F. Sanner – Текст : непосредственный // J. Mol. Graph. Model. – 1999. – Vol.17. – P.57–61.

28 ЯМР скрининг потенциальных ингибиторов Citrobacterfreundii метонин  $\gamma$ -лиазы / Е. А. Батуев, А. Ю. Лизунов, Е. А. Морозова [и др.]. – Текст : непосредственный // Молекулярная биология. – 2014. – Т.48, №6. – С.1019–1029.

29 Shimotakahara, S. Application of NMR screening techniques for observing ligand binding with a protein receptor / S. Shimotakahara, K. Furihata, M. Tashiro. – Текст : непосредственный // Magn. Reson. Chem. – 2005. – Vol. 43. – P. 69–72.

30 Алексеев, Д. И. Белки и их свойства / Д. И. Алексеев. // Вопрос «Зенит». – 2003. – 216 с. – Текст : непосредственный

31 NMR-based screening with competition water– ligand observed via gradient spectroscopy experiments: detection n of high-affinity ligands / C. Dalvit, M. Fasolini, M. Flocco, S. Knapp, P. Pevarello, and M. Veronesi. – Текст : непосредственный // Journal of medicinal chemistry. – 2002. – Vol. 45, N 12. – P. 2610–2614.

32 Human serum albumin isoforms: genetic and molecular aspects and functional consequences / U. Kragh-Hansen, L. Minchiotti, M. Galliano, Jr T.

Peters. – Текст : непосредственный // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2013. – Vol 1830, N 12. – P. 5405–5417.

33 Sphingosine 1-phosphate in blood: function, metabolism, and fate / A. V. Thuy, C. M. Reimann, N. Y. Hemdan, M. H. Graler. – Текст : непосредственный // *Cell. Physiol. Biochem.* – 2014. – Vol. 34, N 1. – P. 158–171.

34 Human serum albumin: from bench to bedside / G. Fanali, A. Masi, V. Trezza, M. Marino, M. Fasano, P. Ascenzi – Текст : непосредственный // *Mol. Aspects Med.* – 2012. – Vol. 33, N 3. – P. 209–290.

35 Органическая химия нуклеиновых кислот : Химия / Н. К. Кочетов, Э. И. Будовский, Е. Д. Свердлов, Н. А. [и др.] ; под ред. Шибяев В. Н. – М.: Химия. – 1970. – 256 с. – Текст : непосредственный.

36 Walker, R.T. Nucleoside analogues. Chemistry, biology, and medical applications / R.T. Walker. – Текст : непосредственный // N.Y. – L – 1979. – P. 365.