



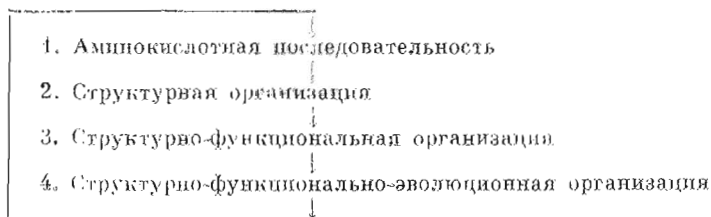
УДК 547.962 : 541.63

© 1992 г. Е. М. Попов

**ПОДХОД К ИССЛЕДОВАНИЮ ПРИРОДНЫХ ОЛИГОПЕПТИДОВ
В НАПРАВЛЕНИИ ОТ СТРУКТУРЫ К ФУНКЦИИ***Всероссийский заочный институт пищевой промышленности, Москва*

Обсуждены структурные и структурно-функциональные организации природных олигопептидов и белковых рецепторов. Разработан подход к исследованию биологических действий низкомолекулярных пептидов в направлении от структуры к функции. Показано, что полифункциональность олигопептидов обусловлена возможностью пространственного строения молекул принимать в физиологических условиях ограниченный набор определенных структур. Отдельная функция пептида реализуется посредством характерной только для нее конформации из числа самых предпочтительных для свободной молекулы. Рассмотрен метод целенаправленного конструирования искусственных аналогов, пространственное строение которых отвечает набору низкоэнергетических, физиологически активных конформационных состояний природного олигопептида.

Проблема природных олигопептидов и белков включает четыре фундаментальные задачи, представленные с указанием иерархических связей между ними на следующей схеме:



Первая задача состоит в установлении химического строения соединения — определении порядка расположения стандартных аминокислот в пептидной цепи. Содержание второй задачи заключается в идентификации пространственной формы и конформационной динамики молекулы по известной аминокислотной последовательности. Третья задача имеет дело со структурой и функцией и посвящена изучению зависимости биологических и физиологических свойств пептидов и белков от их молекулярной структурной организации. И наконец, последняя задача рассматривает эти соединения с эволюционной точки зрения, как исторические объекты. Здесь интегрируется вся предшествующая информация и формируется представление о триединстве структуры, функции и эволюции природных пептидов и белков.

Представленная схема охватывает исследования пептидов и белков всех направлений и классифицирует их по группам, образующим замкнутый цикл в системе четырех обобщенных координат (вещества, пространственной формы, функции и времени). Стрелки указывают субординационные связи и тем самым устанавливают логически оправданный порядок рассмотрения фундаментальных задач в направлении от простого к сложному или, более конкретно, от структуры к функции. В настоящем сообщении изложены основы такого подхода и обсуждены его возможности в изучении свойств природных олигопептидов.

Тема структурной и структурно-функциональной организации природных олигопептидов привлекает к себе большое внимание по двум причинам. Во-первых, эти соединения чрезвычайно интересны сами по себе, причем интересны как в чисто познавательном, так и прикладном отношении. Они обладают уникальными свойствами и принимают активное участие во многих процессах жизнедеятельности. Во-вторых, повышенным вниманием к себе природные олигопептиды обязаны родственными связями с белками. Они близки к последним эволюционным происхождением и принадлежностью к одному химическому типу соединений. Кроме того, пептиды и белки сближают также биологические процессы, содержание которых и очень многих случаях составляют валентные и невалентные взаимодействия между ними. Так что знание свойств низкомолекулярных пептидов имеет первостепенное значение в изучении высокомолекулярных соединений той же природы.

При сопоставлении свойств природных олигопептидов и белков следует иметь в виду некоторую неопределенность в их разделении. Встречающиеся в природе аминокислотные последовательности образуют практически сплошной ряд соединений с постепенно возрастающим числом остатков в цепи от нескольких единиц до многих сотен. Естественно ожидать, что по мере перехода от низкомолекулярных пептидов к высокомолекулярным белкам конформационные возможности молекул меняются не скачкообразно, а монотонно. Например, очевидно, что межостаточные невалентные взаимодействия, локализованные на сравнительно небольших участках аминокислотной последовательности, играют одинаковую роль в формировании и олиго- и полипептидов. В связи с этим понимание пространственного строения и механизма спонтанной, быстрой и безошибочной сборки белковой последовательности в нативную конформацию невозможно без установления принципов пространственной организации эволюционно отобранных низкомолекулярных пептидов. Поскольку между природными олиго- и полипептидами нет четко очерченных границ, конформационная теория более простых молекул является естественной составной частью конформационной теории более сложных молекул той же природы. По-видимому, определенная преемственность имеет место и в отношении структурно-функциональной организации природных олигопептидов и белков.

I. Структурная организация олигопептидов

Ранее с помощью полужемпирического метода конформационного анализа было изучено пространственное строение многих десятков природных олигопептидов и их синтетических аналогов, содержащих от 5 до более чем 30 аминокислотных остатков [1, 2]. В результате были сформулированы следующие принципы структурной организации молекул этих соединений [2].

1. В физиологических условиях пространственное строение природного олигопептида описывается ограниченным набором низкоэнергетических компактных структур, стабильность которых обусловлена согласованностью всех внутримолекулярных и межостаточных невалентных взаимодействий атомов.

2. Предпочтительные структуры олигопептида могут различаться между собой шейками пептидного скелета, в пределах одного шейка — формами основной цепи и в пределах одной формы — ориентациями боковых цепей.

3. Сдвиг положения равновесия между немногочисленными структурами олигопептида осуществляется по вполне определенному низко-

энергетическому механизму, включающему ряд последовательных конформационных переходов.

4. Высокая чувствительность (легкая адаптируемость) положения конформационного равновесия природного олигопептида к окружающей среде (растворителю, рецептору, ферменту) обусловлена строгой избирательностью низкоэнергетических конформационных состояний к специфическим изменениям внешних условий.

Что общего и чем различаются структурные организации молекул природных олигопептидов и белков? Одно различие между ними очевидно: пространственное строение низкомолекулярных пептидов характеризуется набором структур, т. е. положением конформационного равновесия, а белков — единственной в нативных условиях трехмерной структурой. Дальнейшее обсуждение этого вопроса требует привлечения более детальной информации о структурной организации белковых молекул. Используем для этой цели разработанные автором бифуркационную термодинамическую модель самопроизвольного свертывания природной полипептидной цепи и физическую конформационную теорию белков, позволяющую по известной аминокислотной последовательности предсказывать геометрию нативной трехмерной структуры и количественно оценивать потенции последней к конформационным перестройкам. Подробно и в доказательном плане этот материал изложен в монографии [2]. Сейчас лишь кратко только о том, что требуется для установления генетической связи между структурными организациями природных олигопептидов и белков.

Важнейшая особенность белковой цепи заключена в специфической конформационной неоднородности природной аминокислотной последовательности, определяющей существование необратимых флуктуаций и возникновение бифуркаций, а следовательно, и саму возможность спонтанного появления высокоорганизованной структуры из хаоса. Можно утверждать, что суть этого явления состоит в наличии четкой взаимообусловленности между химическим строением, конформационными свойствами и необратимыми флуктуациями. Гетерогенность аминокислотной последовательности ответственна за различие в конформационных возможностях ее отдельных участков, что, в свою очередь, порождает термодинамическую неоднородность флуктуаций, дифференциацию их на равновесные (обратимые) и неравновесные (необратимые). Сочетание последних, т. е. бифуркации, и порядок их следования определяют содержание и направление механизма быстрой и безошибочной самосборки белковой цепи. Такая связь присуща только эволюционно отобраным аминокислотным последовательностям. В случае же гомогенных, регулярных или даже гетерогенных синтетических полипептидов со случайным порядком аминокислот тот же беспорядочный по своему характеру процесс не имеет развития и не выводит цепь из состояния статистического клубка.

Чтобы беспорядочно-поисковый механизм смог действительно привести к свертыванию цепи, селекция бифуркационных флуктуаций не должна представлять собой перебор всевозможных комбинаций всех случайных изменений целой полипептидной цепи, количество которых и необходимое для их реализации время невероятно велики. Свертывание произойдет только в том случае, если структурирование белковой глобулы инициируется и определенное время развивается независимо в разных местах последовательности. Это будет иметь место при чередовании в белковой цепи участков, существенно различающихся по своим конформационным свойствам. Ориентировочно их можно разделить на две группы. В первую группу входят конформационно-жесткие фрагменты, пространственное строение которых почти полностью определяется взаимодействиями входящих в них остатков. Вторая группа включает конформационно-лабильные фрагменты цепи. Свою окончательную пространствен-

ную форму они обретают после реализации не только ближних, но и дальних межостаточных взаимодействий. Расчеты большого числа сложных природных олигопептидов (25—35 остатков в цепи) и двух низкомолекулярных белков (нейротоксина II и трипсинового ингибитора) обнаружили в организации их пространственных структур следующие характерные черты, очевидно, общие для белковых аминокислотных последовательностей.

1. Конформационные возможности всех фрагментов белковой цепи в значительной мере определяются природой и порядком расположения входящих в них аминокислотных остатков.

2. Конформационно-жесткие и лабильные фрагменты альтернируют вдоль полипептидной цепи белка и в начальной стадии свертывания практически независимы друг от друга.

3. Жесткие и лабильные фрагменты сравнительно невелики и включают не более 12 остатков (жесткие фрагменты большей длины имеют несколько центров их образования).

Сборка белка при соблюдении отмеченных условий начинается одновременно и практически независимо на конформационно-жестких фрагментах, разделенных лабильными участками последовательности, т. е. по существу как сборка нескольких олигопептидных молекул, связанных между собой довольно гибкими цепями. Случайный и беспорядочный перебор всех возможных флуктуаций практически автономных друг от друга жестких фрагментов рано или поздно, но непременно приведет к возникновению у каждого из них бифуркационной комбинации необратимых конформационных изменений, отвечающих уникальному сочетанию флуктуаций, входящих во фрагмент остатков. Время, необходимое для структурной самоорганизации пептидного участка из n остатков по беспорядочно-поисковому механизму, равно, согласно Уетлауферу, $t=10^{n-12}$ с. Следовательно, продолжительность сборки конформационно-жесткого фрагмента с $n < 12$ не превышает 10^{-2} с, т. е. вполне реально.

Альтернирующие вдоль белковой цепи конформационно-лабильные участки приблизительно той же длины за это время также претерпевают серьезные изменения. Реализация у них внутренних межостаточных взаимодействий приводит к ограничению конформационной свободы. Из огромного массива случайных состояний путем все того же беспорядочного перебора обратимых и необратимых флуктуаций за время $t=10^{n-12}$ с возникает более ограниченный набор относительно устойчивых и при отсутствии дальних взаимодействий изоэнергетических состояний.

Из описанной картины свертывания полипептидной цепи следует, что природные олигопептидные молекулы по своей структурной организации весьма близки конформационно-жестким фрагментам белковой цепи. Нативную конформацию белка можно представить в виде ассоциации олигопептидных молекул, находящихся в конформациях, с одной стороны, отвечающих их низкоэнергетическим состояниям, а с другой — лучше всего обеспечивающих плотнейшую упаковку белковой глобулы, т. е. образующих наибольшее число стабилизирующих контактов между собой и с соединяющими их последовательностями. Изолированные конформационно-жесткие белковые фрагменты, лишенные дополнительной внешней стабилизации, имеют структурную организацию, полностью соответствующую структурной организации природных олигопептидных молекул.

Пространственное строение рассматриваемых природных олигопептидов, как и строение синтетических олиго- и полиаминокислот, описывается не однозначно детерминированной структурой, а положением конформационного равновесия. Различие, весьма существенное, состоит в том, что оно здесь относится не к огромной массе обратимо флуктуирующих форм статистического клубка искусственного пептида, а к небольшому коли-

честву низкоэнергетических бифуркационных состояний, однако также легко мигрирующих друг в друга.

Знание принципов молекулярной структурной организации и умение количественно предсказывать, исходя из аминокислотной последовательности, конформационные возможности природных олигопептидов — это первый необходимый шаг на пути к познанию структурно-функциональной организации молекул. Однако перед тем, как сделать следующий шаг в этом направлении, необходимо хотя бы кратко рассмотреть еще два вопроса.

Первый вопрос касается реальности результатов теоретического конформационного анализа и, следовательно, достоверности сделанных обобщений, а второй затрагивает возможность существующих экспериментальных методов исследования и перспективы используемого эмпирического подхода от функции к структуре.

Отношение к теоретическим, расчетным данным, естественно, зависит от убежденности в том, что они, если и не всегда строго количественно, то по крайней мере качественно правильно отражают характерные черты описываемых ими опытных фактов, явлений, закономерностей. Объективное представление о точности априорно рассчитываемых геометрических параметров молекул имеет в нашем обсуждении особый смысл, поскольку именно теоретический подход, как станет ясно из дальнейшего обсуждения, должен стать основой строгого решения необычной по своему характеру, общности, научной и практической значимости задачи структурно-функциональной организации природных олигопептидов.

Реальность расчета пространственного строения пептидов редко когда удастся проверить путем прямого сопоставления теоретических результатов с опытными данными. Низкомолекулярные пептиды обладают повышенной по сравнению с белками конформационной лабильностью, и поэтому получение их в кристаллической фазе является сложной, чаще всего неразрешимой задачей. Следовательно, применение рентгеноструктурного анализа к изучению пространственного строения олигопептидов крайне ограничено. Но даже если и удастся вырастить пригодные для этого метода кристаллы и получить дифракционную картину, возникают серьезные осложнения с ее интерпретацией. Для расшифровки рентгенограммы в данном случае нельзя воспользоваться методом изоморфного замещения, так как внедрение тяжелых атомов в образующие кристаллическую решетку олигомерные молекулы может сильно исказить их конформационное состояние; этот метод в исследовании олигопептидов в отличие от белков не является действительно изоморфным. В то же время олигопептиды слишком сложны для использования прямого метода рентгеноструктурного анализа, обычного в исследованиях простых органических молекул. Но если и удастся, что маловероятно, преодолеть все отмеченные выше трудности, то задача тем не менее по-прежнему останется нерешенной. В лучшем случае из набора низкоэнергетических потенциально физиологически активных конформаций пептида станет известна лишь одна, склонная к образованию кристаллической решетки, но, быть может, не имеющая отношения к функционированию соединения.

При исследовании пространственного строения природных пептидов в растворе широко используются физико-химические, и прежде всего оптические и резонансные спектральные методы. Однако и в этом случае структурная задача этих соединений по целому ряду причин также не получает решения. Наиболее серьезная из них связана с особенностью постановки самой задачи, формулировка которой для природных олигопептидов более сложна по сравнению как с белками, так и с синтетическими олиго- и полиаминокислотами. Для последующего изучения структурно-функциональной организации этих соединений недостаточно зна-

ния лишь одной глобальной по энергии конформации, как в случае белков, или представления о среднестатистическом конформационном состоянии, как в случае синтетических пептидов. Здесь требуется количественная оценка геометрических параметров ряда структур, их конформационных возможностей и вероятности реализации в различных условиях. Получение такой информации находится за пределами чувствительности и интерпретационных возможностей физико-химических методов. Более того, из-за сложности соединений и недостаточной разработанности физических основ соответствующих явлений ни один из методов пока не позволяет однозначно и достаточно полно описать даже одно, пусть доминирующее в растворе, конформационное состояние пептида, используя для этого результаты собственных экспериментальных измерений.

Этот вывод очевиден из анализа данных практически всех исследований структуры олигопептидов, проведенных с помощью физико-химических методов. Например, к расшифровке пространственного строения октапептидного гормона ангиотензина II был привлечен практически весь комплекс существующих методов: спектры ^1H - и ^{13}C -ЯМР, ЭПР, кривые ДОВ и КД, ИК- и Раман-спектры, флуоресцентный анализ, изотопный обмен и др. В результате разными авторами было предложено семь совершенно различных моделей пространственной структуры октапептидного гормона, отвечающих данным одного или сразу нескольких методов. Однако ни одна из этих моделей, отражающих состояние только основной цепи молекулы, не удовлетворяет всей совокупности экспериментальных фактов [3]. Подобная неопределенность свойственна также трактовкам многочисленных экспериментальных данных о структуре нейрогипофизарного гормона окситоцина [4], хотя в этом случае изучение структуры облегчалось наличием дисульфидной связи между первым и шестым остатками.

Примеры с ангиотензином и окситоцином, наиболее детально и всесторонне изучаемыми последние два десятка лет пептидными гормонами, убедительно демонстрируют ограниченность известных физико-химических методов в познании структурной организации природных пептидов. Не отрицая ценности экспериментальных данных, можно тем не менее говорить о невозможности в настоящее время решения только на их основе структурной задачи в требуемом объеме — установления геометрии и конформационной динамики низкоэнергетических структур природного пептида. Господствующий в конформационных исследованиях пептидов, как, впрочем, и белков, чисто эмпирический подход далеко не в полной мере адекватен природе изучаемого явления. В наличии существенного разрыва между требуемой информацией и возможностями эксперимента причина отсутствия в течение длительного времени (с конца 60-х годов) ощутимого прогресса в этой области.

На сегодняшний день возможности существующих физико-химических методов ограничены получением данных в пользу той или иной гипотетической или априорно рассчитанной структуры. Но и здесь опытная проверка результатов теоретического конформационного анализа пептидов имеет свои особенности. Так, хорошее совпадение результатов расчета с экспериментальными данными, хотя и является положительным фактом, не может служить надежным критерием правильности теоретического предсказания. С другой стороны, отсутствие совпадения, как это не кажется странным, также не означает бесспорного доказательства переальности результатов расчета. Различие теоретических и опытных данных может быть вызвано причинами, не играющими определяющей роли в последующем изучении структурно-функциональной организации пептида. Например, четко наблюдаемое несовпадение будет иметь место при правильном определении всего набора низкоэнергетических конформаций

и удовлетворительной оценке геометрии каждого состояния, но при неполном соответствии теоретически найденного расположения конформаций в шкале энергии действительному порядку (достаточна разница в 1,5–2,0 ккал/моль). Если первый момент, как мы увидим в последующем изложении, принципиален для изучения функции, то последний не представляется столь необходимым. Так что сопоставление теории и опыта здесь весьма своеобразно и довольно часто не имеет того решающего значения, которое придается ему традиционно.

Изучение структуры и функции природных олигопептидов диктует необходимость широкого использования теоретического подхода, что, в свою очередь, делает чрезвычайно актуальным контроль получаемых при этом результатов. Выход из сложившейся ситуации был найден с помощью самого же теоретического подхода [1]. На его основе были предложены два способа проверки, использование которых подтвердило справедливость теории пространственной организации природных пептидов и физическую молекулярную модель, разумность выбранной схемы конформационного анализа и правильность конкретных результатов априорного расчета [2].

Первый способ оценки результатов расчета вообще не требует каких-либо экспериментальных фактов о пространственном строении. Его суть заключается в выборе для теоретического исследования таких объектов, расчет которых содержит внутренний, автономный контроль своих результатов. Естественными реперами могут служить, например, внутримолекулярные дисульфидные связи.

Согласно теории [2, 5, 6] и термодинамической гипотезе Анфинсена [7], предпосылки для окислительной реакции атомов серы цистеинов, образующих в пептидах дисульфидные мостики, обусловлены стерической предрасположенностью соответствующих участков аминокислотной последовательности к таким конформационным состояниям, в которых остатки Cys оказываются сближенными, а их боковые цепи имеют необходимую для создания S—S-связи взаимную ориентацию. В процессе свертывания полипептидной цепи сближенность цистеинов в самых низкоэнергетических конформациях линейной последовательности достигается за счет согласованных стабилизирующих невалентных взаимодействий между всеми остатками цепи. При априорном многостадийном конформационном анализе достаточно сложного пептида автоматический приход на завершающем этапе расчета к наиболее низкоэнергетическим конформациям линейной последовательности с близкими контактами между остатками Cys, образующими согласно химическим данным дисульфидную связь, можно ожидать только в случае адекватности всех положенных в основу расчета теоретических предпосылок и верном количественном описании конформационного состояния молекулы. Способ внутреннего контроля был апробирован в анализе большого количества весьма сложных цистинсодержащих пептидов (нонапептидных нейротрофических гормонов [4], апамина [8], тертиамина [9] и МСД-пептида [10], содержащих соответственно 18, 21 и 22 аминокислотных остатка, в том числе четыре цистеина, образующих две дисульфидные связи, инсектотоксина [11] из 36 остатков, из которых восемь цистеинов, и др. [1]).

При втором способе корректность конформационного анализа проверяется путем сопоставления результатов расчета конформационных возможностей олигопептидных фрагментов с опытными данными о геометрии кристаллографической структуры белка. Такое сравнение в настоящее время реально для двух низкомолекулярных белков — бычьего панкреатического трипсина ингибитора (58 остатков в цепи) и нейротоксина II (61 остаток), для которых впервые в научной практике был выполнен априорный расчет трехмерных структур [12, 13]. Приведу данные для

трипсинового ингибитора, пространственное строение которого описывается ~ 300 двугранными углами, определяющими геометрию всех основных и боковых цепей (ϕ , ψ , ω и χ). Из сопоставления расчетных значений этих углов с экспериментальными значениями, полученными рентгеноструктурным анализом с разрешением $1,5 \text{ \AA}$, следует, что найденная априорно конформация молекулы ингибитора полностью соответствует кристаллографической структуре. Среднеквадратичные отклонения опытных и теоретических значений двугранных углов основной цепи составляют 13° для углов ϕ , 13° для ψ и 9° для ω . В пределах ошибок рентгеноструктурного анализа белков хорошего разрешения ($1,5\text{--}2,0 \text{ \AA}$) находится также величина среднеквадратичного отклонения двугранных углов боковых цепей χ (18°).

Таким образом, достоверность и достаточно высокая точность результатов теоретического конформационного анализа олигопептидов подтверждаются и при самоконтролируемом расчете (по автоматическому образованию правильной системы дисульфидных связей), и при расчете белковых молекул (по совпадению геометрии теоретической и кристаллографической структур). Следовательно, конформационная теория и метод расчета [2] отражают реальную пространственную организацию молекул природных олигопептидов.

II. Структурно-функциональная организация пептидов

Современное изучение механизмов физиологического действия пептидных гормонов, как и много десятилетий назад, проводится не только при отсутствии минимально необходимой информации о сопряженных рецепторах, но фактически и без знания структурной организации самих природных пептидов. Исследования, как правило, строятся на результатах кинетических измерений и биологических испытаний гормона и его синтетических аналогов, причем последние выбираются методом проб и ошибок, т. е., строго говоря, вслепую. Таким образом, в изучении природных олигопептидов господствует чисто эмпирический подход в единственно возможном в этом случае направлении — от функции к структуре.

Игнорирование информации о геометрии и конформационных возможностях молекул по существу означает поиск изначально несуществующей прямой зависимости между химическим строением и биологической активностью. Более того, при подходе от функции к структуре явно или неявно предполагается существование непосредственной и достаточно простой связи между отдельными аминокислотными остатками и функциями пептида. Идея аддитивности с неизбежностью означает элиминацию кооперативности структурной организации и стерической комплексности взаимодействующих молекул, индуцированного характера и многостадийности биологических процессов. Между тем, уже давно очевидно, что этого никак делать нельзя, поскольку в основе биологических процессов, их взаимообусловленности, высокой чувствительности, строгой избирательности, эффективности и автоматизма лежат тонкие стерические соответствия взаимодействующих молекул, определяемые главным образом спецификой структурной организации пептидов и белков.

При использовании подхода от функции к структуре отсутствие объективной информации о пространственной организации пептидов, являющейся естественным промежуточным звеном между химическим строением и биологической активностью соединений, компенсируется феноменологическими описаниями, а часто просто фантазиями авторов. В литературе имеется множество всякого рода гипотетических представлений, иногда взаимоисключающих, о структурной организации пептидов. Нет недостатка в терминологических новшествах и в формулировках всевоз-

можных «принципов» и «законов», усложненных современной системно-кибернетической фразеологией (принцип сигнатур, эквивации, двусмысленности и т. п.; см., например, [14]). Предложенные трактовки механизмов действия природных пептидов имеют сугубо описательный характер и лишены предсказательной силы. В этом легко убедиться, если обратиться к самым многочисленным исследованиям в этой области, посвященным ангиотензину [3], брадикининпотенцирующим пептидам [15, 16] и нейрогипофизарным гормонам [4].

Итак, следует признать, что чисто эмпирический путь к установлению прямой связи между биологической активностью и химическим строением (т. е. подход от функции к структуре) малоэффективен, а в познавательном, научном, отношении бесперспективен. Для изучения влияния электронных и стерических аспектов молекулярного строения на эффективность специфического взаимодействия необходимо знание принципов структурной организации и конкретных конформационных свойств природного олигопептида и его синтетических аналогов. Иными словами, требуется информация о потенции молекул к специфическим взаимодействиям. Отсюда неизбежен вывод о необходимости привлечения к изучению структурно-функциональной организации гормонов, как и других физиологически активных природных олигопептидов, теоретических методов и изменения направления исследований на противоположное, т. е. использования подхода от структуры к функции. Рассмотрим его возможности при современном уровне знаний.

При решении задачи о структурно-функциональной организации природных олигопептидов будем считать известными аминокислотную последовательность гормона и спектр его физиологического действия с количественными оценками каждой функции. По известному химическому строению пептида могут быть рассчитаны конформационные возможности молекулы и выявлен набор потенциально активных низкоэнергетических форм. На основе этих данных, которые можно считать достаточно надежными, требуется установить, идя от структуры к функции, зависимость между электронно-конформационными и физиологическими свойствами природного пептида.

Физиологические свойства пептидов проявляются в процессе их взаимодействий с рецепторами. Поэтому представляется невозможным познать особенности структурно-функциональной организации пептидов, не располагая соответствующей информацией об организации сопряженных с ними рецепторов. Между тем такая информация или полностью отсутствует, или крайне скудна. Следовательно, в нашем последующем рассмотрении мы вынуждены будем, обсуждая свойства белковых рецепторов, привлекать гипотетические представления об их конформационных и функциональных особенностях.

Прежде всего, мы предполагаем, что совершающиеся в живых организмах пептид-белковые взаимодействия, независимо от строения конкретных объектов и характера биологической функции, имеют единую физико-химическую природу. Следовательно, с общей естественно-научной позиции все многочисленные и чрезвычайно разнообразные функции пептидов и белков делятся на две группы явлений — физических и химических. Первые осуществляются посредством невалентных взаимодействий пептидов и белков между собой и с молекулами иной природы. Они могут быть статичными, как в случае структурных белков, либо динамичными, например при активном транспорте метаболитов. Химические функции наряду с невалентными непременно включают валентные взаимодействия, приводящие к обратимым или необратимым изменениям химического строения молекул. Примером могут служить ферментативные реакции, реализующие весь комплекс взаимодействий как невалентных, физиче-

ских, так и валентных, химических. Сделанное выше допущение предполагает, что взаимодействия пептидного гормона с белковым рецептором по своей сути аналогичны взаимодействиям пептидного субстрата с протеолитическим ферментом. Если это так, то особенности структурной и структурно-функциональной организации гормона совпадают с субстратом, а рецептора — с ферментом.

Что касается принципов структурной организации молекул пептидных субстратов и пептидных гормонов, то их идентичность можно уже считать надежно установленным фактом.

Особенности структурно-функциональной организации молекул ферментных белков были выявлены нами ранее с помощью априорных (т.е. строго в направлении от структуры к функции) расчетов многостадийных механизмов элементарных актов биокатализа α -химотрипсина и β -трипсина [17--20]. В достаточно полном виде они могут быть сформулированы следующим образом.

1. Активный центр нативного фермента предрасположен, во-первых, к сорбции специфического субстрата в конформации, которая в свободном состоянии молекулы является одной из наиболее предпочтительных, и, во-вторых, к вполне определенным собственным конформационным изменениям, необходимым для последующих химических взаимодействий.

2. Невалентные фермент-субстратные взаимодействия и образование комплекса Михаэлиса не приводят ни в молекуле субстрата, ни в молекуле фермента к возникновению стерических напряжений или принудительных деформаций. Имеющие место на этой стадии катализа конформационные изменения происходят исключительно благодаря взаимодействиям стабилизирующего характера; неблагоприятные контакты между атомами фермента и субстрата просто отсутствуют.

3. В комплексе Михаэлиса и в последующих невалентных комплексах многостадийного каталитического акта создаются из атомных групп фермента и чувствительного фрагмента субстрата полифункциональные замкнутые системы, предрасположенные к соответствующим специфическим реакциям (например, в комплексах α -химотрипсина и β -трипсина это реакции ацилирования и дезацилирования). В каждой из таких систем реализуется цепь взаимообусловленных, катализирующих друг друга реакций, инициация и протекание которых не требуют энергии активации. Роль комплекса Михаэлиса заключается в создании именно такой автокаталитической замкнутой системы, а не в приведении субстрата к напряженной структуре, близкой к геометрии переходного состояния, и каталитически активных групп к напряженным конформациям, обладающим повышенной реакционной способностью. Ускорение ферментативной реакции происходит благодаря тому, что в такой системе по существу три-, тетра- и даже более высокого порядка реакции сводится к мономолекулярной реакции.

4. После создания комплекса Михаэлиса, как и других промежуточных невалентных комплексов, необходимая для электронных, химических взаимодействий между функциональными группами замкнутой системы дополнительная сближенность может осуществляться за счет броуновских соударений и синфазных нормальных колебаний макромолекулярного образования.

5. Самые низкоэнергетические конформационные состояния комплексов на всех стадиях каталитического акта соответствуют продуктивной взаимной ориентации реагирующих атомных групп фермента и субстрата, т.е. такому их взаимному расположению, которое в максимальной степени предрасположено к их целенаправленному химическому взаимодействию. Непродуктивные конформации фермент-субстратных комплексов энергетически значительно менее предпочтительны, и их реализация

маловероятна. Переход между всеми химически нестабильными промежуточными состояниями сопровождается незначительными и не вызывающими стерических напряжений конформационными изменениями.

Таким образом, фермент выполняет свою функцию, не прибегая к созданию у чувствительного места субстрата и у каталитических групп активного центра особой реакционной способности путем их принудительной деформации. Каталитический акт фермента представляет собой конформационно ненапряженный процесс. Исключительная эффективность и строгая специфичность биологического катализа осуществляется не за счет создания особых высокоэнергетических электронно-конформационных состояний фермента и субстрата, как это декларируется во всех существующих концепциях. Исключительность этого спонтанного природного явления, совершающегося безошибочно и в очень мягких условиях, заключается, напротив, в чрезвычайной простоте и естественной гармонии выработанных эволюцией взаимоотношений между ферментом и субстратом на всех стадиях. Биологический катализ имеет мало аналогий с обычным химическим катализом, и его механизм не может быть воспроизведен так называемой конгруэнтной модельной системой.

Согласно сделанному предположению, перечисленные выше принципы структурно-функциональной организации ферментов могут быть отнесены к белковым рецепторам. Мы сознательно не стали вносить терминологических изменений и заменять принятые в физиологии понятия на какие-либо другие, менее специфические. Ферментативный катализ, состоящий из альтерпирующих физических и химических явлений, относится к наиболее сложным процессам жизнедеятельности. Поэтому приведенные принципы имеют общий характер и могут быть легко сведены к тому или иному частному случаю. Если взаимодействие природного олигопептида с белковым рецептором также включают оба эти явления, т. е. невалентные и валентные взаимодействия, то в приведенном описании нужно заменить лишь некоторые слова. Например, вместо слова «фермент» следует поставить «белковый рецептор», а вместо слова «субстрат» — «белковый гормон» или что-либо другое. Если же пептид-рецепторные взаимодействия — чисто физические явления, то в описании следует опустить все то, что касается химической стороны ферментативного катализа.

Теперь у нас есть необходимые критерии, которым должна удовлетворять структурно-функциональная организация природных олигопептидов. Во-первых, она обязана отвечать уже известной нам структурной организации этих молекул, т. е. являться следствием последней. Во-вторых, представлять собой комплементарное дополнение к предложенной выше структурно-функциональной организации белковых рецепторов. И в третьих, не противоречить известным опытным фактам о физиологической активности ряда природных пептидов и их синтетических аналогов.

Хотя отмеченные критерии и необходимы, однако они еще недостаточны для окончательной, т. е. обладающей доказательной силой, формулировки на их основе принципов структурно-функциональной организации природных олигопептидов. Крайне слабая изученность рецепторов, являющихся, как правило, мембранными интегральными белками, не позволяет однозначно ответить на вопрос о причине полифункциональности пептидных гормонов. Согласно одной точке зрения [16], «способность гормона стимулировать совершенно разные процессы в различных частях организма объясняется гетерогенностью рецепторов — наличием нескольких специфических для данного гормона рецепторных белков. Более распространенная точка зрения, согласно которой каждый гормон может образовывать продуктивный комплекс только с одним рецептором и, следовательно, вызывать всегда одно и то же аллостерическое изменение его конформации. В предположении гомогенности рецепторов полифункцио-

нальность гормона связывается уже не со спецификой самих гормон-рецепторных взаимодействий, а с особенностями воспринимающих посылаемый сигнал систем. Естественно допустить возможность существования механизмов, отвечающих обоим трактовкам гормон-рецепторных взаимодействий.

Экспериментальные данные о рецепторах, особенно полученные в последние годы, свидетельствуют в пользу их гетерогенности. Так, для ангиотензина II, например, удалось выделить из тканей печени кролика, коры надпочечников быка и матки крысы три разных рецептора этого гормона и оценить их молекулярные массы [21]. Содержательная информация, согласующаяся с этой же точкой зрения на причину полифункциональности гормона, имеется по кинетике связывания и физиологической активности ангиотензина II с рецепторами гладкомышечной ткани, коры надпочечников, тканей печени и мозга [22]. На это указывают также разный характер взаимодействий многочисленных аналогов гормона с рецепторами различных тканей и неодинаковое воздействие некоторых катионов на связывание ангиотензина II с рецепторами ряда тканей [23]. Наконец, существенный довод в пользу гетерогенности рецепторов был получен в последнее время в результате обнаружения селективного действия на рецепторы неперитидных антагонистов ангиотензина II (речь идет об антагонистах DUP-89 и WL-19) [24]. Авторам этой работы удалось показать, что рецепторы, расположенные в одном и том же типе ткани (гладкомышечной) и имеющие одинаковое сродство к нативному ангиотензину II, четко дифференцируются по своему отношению к антагонистам гормона. Подобную же дифференциацию обнаруживает природный аналог гормона — des-Asp^1 -ангиотензин II (ангиотензин III). В сообщениях * Т. В. Гогитидзе и автора, посвященных изучению структурно-функциональной организации ангиотензина II, показано, что отмеченные выше, как и все другие имеющиеся на сегодняшний день, экспериментальные данные подтверждают безусловную справедливость предположения о наличии рецепторной гетерогенности. Кстати, только при гетерогенности и возникает сама проблема структурно-функциональной организации пептидных гормонов (точнее, благодаря этому она становится чрезвычайно актуальной). В противном случае полифункциональность будет определяться не структурной организацией пептидной молекулы и особенностями ее взаимодействий с рецепторным белком, а структурными организациями тех систем, которые по-разному откликаются на один и тот же сигнал.

Всем отмеченным ранее условиям и трактовке полифункциональности гормонов гетерогенностью рецепторов удовлетворяют следующие принципы структурно-функциональной организации природных олигопептидов [1, 4].

1. Спектр функционального действия низкомолекулярного пептида обусловлен наличием в физиологических условиях равновесия между несколькими структурами. Иными словами, пространственное строение природной пептидной молекулы предрасположено к осуществлению не одной, а ряда строго определенных функций («конформационное равновесие — полифункциональность»).

2. Отдельная функция пептида реализуется посредством актуальной только для нее конформации, входящей в состав самых предпочтительных структур свободной молекулы, т.е. уникальность геометрии и динамических свойств соответствующего конформационного состояния данной аминокислотной последовательности определяет избирательность и специфичность каждого ее конкретного физиологического действия («одна конформация — одна функция»).

* Готовятся к печати.

3. Эффективность работы природного олигопептида при реализации всех его функций объясняется альтернирующим характером внутримолекулярных взаимодействий, стабилизирующих предпочтительные конформации, и относительной легкостью конформационных превращений. Иными словами, быстрая реакция положения конформационного равновесия на изменение среды обеспечивает резкое повышение концентрации нужной структуры в нужном месте («специфические внешние условия — актуальная конформация»).

Рассмотрев принципы структурной и структурно-функциональной организаций природных олигопептидов и белков, вернемся к определению поставленной выше фундаментальной задачи, касающейся поиска зависимости между структурой и функцией, и попытаемся дать этой задаче более строгую формулировку и наметить общий подход к ее решению. Известными, напомним, являются аминокислотная последовательность пептида и его физиологические функции с количественными оценками активности каждой из них.

Первый шаг, как отмечалось, заключается в решении прямой структурной задачи олигопептида, т. е. в определении для него набора наиболее вероятных, низкоэнергетических конформационных состояний. Мы исходим из предположения, что только предпочтительные по энергии конформации или часть их могут представлять собой те физиологически активные структуры олигопептида, посредством которых осуществляются его функции.

Следующий шаг в определении зависимости между структурой и биологическим действием основывается, с одной стороны, на знании геометрии и конформационных свойств всех актуальных для физиологии исследуемого пептида структур, а с другой — на данных о всем спектре его действий. Таким образом, возникает проблема соотнести набор известных конформаций с набором известных функций, т. е. выяснить для каждого физиологического действия пептида актуальную конформацию. Эта задача в отсутствие конкретной информации о геометрии белкового рецептора не имеет однозначного решения. Ситуация значительно проще в аналогичной по своей постановке задаче о фермент-субстратных взаимодействиях, где известны не только организационные принципы молекул, но и их конформационные возможности и трехмерные структуры. Очевидно, актуальным для реализации функции здесь будет то единственное низкоэнергетическое конформационное состояние свободного субстрата, которое окажется комплементарным геометрии активного центра фермента. В нашем случае активный центр рецептора неизвестен, а поэтому выбор без дополнительной информации невозможен.

При отсутствии данных о пространственных структурах рецепторов, взаимодействующих с различными конформациями рассматриваемого пептида, необходимая информация может быть получена с помощью набора синтетических аналогов природной последовательности, отвечающих специальным требованиям. Каждое соединение такого набора должно быть монофункциональным и, следовательно, принимать только одну из ряда актуальных конформаций природного пептида, комплементарную активному центру соответствующего рецептора. Таким образом, для решения задачи структуры и функции природных олигопептидов необходимы синтетические аналоги, обладающие наперед заданными электронно-конформационными свойствами. По сравнению с прямой структурной задачей (априорным расчетом конформаций по известной аминокислотной последовательности) возникающая здесь задача противоположна по своей постановке, и поэтому мы назвали ее обратной структурной задачей [1].

Обратная структурная задача заключается в теоретическом определении характера химических модификаций, которые необходимы для выде-

ления той или иной актуальной для соответствующей функции природного олигопептида конформации. Более общая цель состоит в целенаправленном конструировании химической структуры молекулы, заведомо принимающей такое пространственное строение, которое необходимо для реализации вполне определенной функции. Решение этой задачи в рамках подхода от структуры к функции открывает широкие перспективы не только для количественного изучения функционирования природных олигопептидов, но и для моделирования активных центров ферментов, поиска лекарственных препаратов, субстратов, ингибиторов, антител и др., сделав этот поиск целенаправленным. До настоящего времени синтез искусственных аналогов, как уже упоминалось, ведется чисто интуитивно, методом проб и ошибок.

Предложенный нами метод решения обратной структурной задачи основан на количественной конформационной теории природных пептидов и белков [2, 5, 6], в частности на оценке особой роли близких взаимодействий в пространственной организации эволюционно отобранных аминокислотных последовательностей и использовании естественных классификаций пептидных структур [6]. Подробно метод описан в работе [1]. Он позволяет до синтеза и биологического испытания целенаправленно конструировать искусственные аналоги, пространственное строение которых отвечает набору низкоэнергетических, физиологически активных конформационных состояний природного олигопептида.

Решение обратной структурной задачи делает реальным использование подхода от структуры к функции. Порядок проведения работы в этом направлении может соответствовать следующей схеме.

1. Теоретический конформационный анализ природного олигопептида и определение всех наиболее предпочтительных по энергии и, следовательно, потенциально физиологически активных конформационных состояний (решение прямой структурной задачи).

2. Создание серии искусственных аналогов, пространственные структуры которых в своей совокупности отвечают набору низкоэнергетических, физиологических активных конформаций (решение обратной структурной задачи).

3. Синтез и биохимическое исследование искусственных модельных аналогов, определение спектра физиологического действия природного олигопептида, количественная оценка функциональной активности, изучение специфических взаимодействий с рецепторами и т. д.

4. Анализ результатов расчета и эксперимента и определение на атомно-молекулярном уровне зависимости между химическим строением, конформационными возможностями и эффективностью реализации физиологических действий природного олигопептида.

Суть этой схемы заключается в том, что экспериментальному изучению структуры, биологической активности и механизма функционирования предшествует теоретическое моделирование с привлечением методов конформационного анализа и квантовой химии. В этом отношении порядок исследования в направлении от структуры к функции соответствует инженерному подходу.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Попов Е. М. // Молекуляр. биология. 1985. Т. 19, № 4. С. 1107-1138.
2. Попов Е. М. Структурная организация белков. М.: Наука, 1989. 352 с.
3. Уматтинов С. Г., Никифорович Г. В., Чипенс Г. И., Шендерович М. Д. Англютезин. Молекулярные механизмы действия. Рига: Зинатне, 1979. 190 с.
4. Спасов В. С., Попов Е. М. // Биоорган. химия. 1981. Т. 7, № 4. С. 25-44; № 4. С. 502-514.
5. Попов Е. М. // Молекуляр. биология. 1975. Т. 9, № 4. С. 578-593.
6. Пороз Е. М. // Intern. J. Quant. Chem. 1979. № 16. P. 707-737.

7. Anfinsen C. B. // Science. 1973. Т. 181. № 2. С. 223-230.
8. Попов Е. М., Мельников П. Н. // Биоорган. химия. 1979. Т. 5. № 10. С. 1471-1494.
9. Ломизе А. Л., Попов Е. М. // Биоорган. химия. 1982. Т. 8. № 10. С. 1474-1485.
10. Ломизе А. Л., Попов Е. М. // Молекуляр. биология. 1983. Т. 17. № 4. С. 1212-1219.
11. Попов Е. М., Швырков В. Н., Спасов В. З. // Биоорган. химия. 1982. Т. 8. № 1. С. 61-71.
12. Попов Е. М., Измайлова Л. И., Мусаев Ш. М., Алиев Р. Э., Ахмедов Н. А., Максужов И. С. // Биоорган. химия. 1982. Т. 8. № 5. С. 776-816.
13. Завальный А. А., Попов Е. М. // Молекуляр. биология. 1982. Т. 16. № 1. С. 129-141.
14. Чипенс Г. Н., Полевая Л. К., Веретенникова Н. И., Крикис А. Ю. Структура и функция низкомолекулярных пептидов. Рига: Зинатне, 1980. 300 с.
15. Monnier H., Dubler L., Cochter R., Mair P. F., Tabler H., Schoenenberger G. // Experientia. 1977. V. 33. P. 548-552.
16. Попов Е. М., Севастьянова Н. Н. // Биоорган. химия. 1981. Т. 7. № 10. С. 1478-1486.
17. Попов Е. М. // Молекуляр. биология. 1977. Т. 11. № 1. С. 5-41.
18. Липкинд Г. М., Максужов И. С., Попов Е. М. // Биоорган. химия. 1975. Т. 1. № 6. С. 966-978.
19. Максужов И. С., Липкинд Г. М., Попов Е. М. // Биоорган. химия. 1975. Т. 2. № 4. С. 632-653; № 5. С. 737-745.
20. Попов Е. М., Годжаев Н. М., Алиев Р. Э. // Молекуляр. биология. 1986. Т. 20. № 2. С. 367-387.
21. Speth R. C., Kim R. H. // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1990. V. 169. № 3. P. 997-1006.
22. Rogg H., Schmid A., de Gasparo H. // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1990. V. 173. № 1. P. 416-422.
23. Howard R. B., Smeby R. R. // Handbook of Hypertension. Pathophysiology of Hypertension - Regulatory Mechanisms. 1986. V. 8. P. 389-397.
24. Chang R. S. L., Lotti V. J. // Mol. Pharm. 1990. V. 37. № 3. P. 347-351.

Поступила в редакцию
6.IV.1992

Е. М. ПОПОВ

AN APPROACH TO INFERRING FUNCTION OF NATURALLY OCCURING OLIGOPEPTIDES FROM THEIR STRUCTURE

Institute for Food Industry, Moscow

Structure and structure-function relations of naturally occurring oligopeptides and peptide receptors are discussed. An approach to inferring function of low-molecular peptides in the direction from their structure is postulated. Diverse biological activities of oligopeptides supposedly arise from a limited number of preferable spatial structures which may exist under physiological conditions. Each particular function of an oligopeptide is connected with a definite spatial structure, belonging to the set of the low-energy conformations. A method is suggested for constructing a synthetic analogue with a predetermined physiologically active conformation, prior to all chemical and biological tests.