

БЕЛКИ И ПЕПТИДЫ

Строение белков и пептидов

Химический синтез
и химическая модификация

Роль белков и пептидов в биологии



Гарвей [Harvey] Уильям (1578—1657), английский врач, основатель современной физиологии. Окончил Кембриджский университет (1597), с 1609 г. преподавал в Королевском университете. Основатель учения о кровообращении.

Белки, или протеины,— важнейший класс биологически активных веществ. Они играют ключевую роль в клетке, присутствуют в виде главных компонентов в любых формах живой материи, будь то микроорганизмы, животные или растения. Без белков невозможно представить себе жизнедеятельность, жизнь; и именно в этом смысле и сегодня сохраняет свое значение определение Ф. Энгельса: «Жизнь есть способ существования белковых тел». Белки чрезвычайно разнообразны по структуре и выполняют многочисленные биологические функции (схема 1).

В настоящее время трудно оценить общее число белков во всем царстве живой природы, но, учитывая огромное разнообразие организмов, следует признать факт существования по крайней мере многих миллиардов химически индивидуальных белков. Лишь в клетке *Escherichia coli* содержится более 3000 различных белков.

Молекулярная масса белков варьирует от 5 — 10 тыс. до 1 млн. и более. Сравнительно небольшие молекулы белковой природы (с молекулярной массой условно до 5000) называются пептидами. К пептидам относятся многие природные вещества с важными биологическими функциями (схема 2), их синтетические аналоги, а также продукты расщепления белков.

Биологические функции белково-пептидных веществ. Главная функция *белков-ферментов* — катализ биохимических реакций, и только ее одной было бы достаточно, чтобы считать белки самым важным классом биорегуляторов. Как биологические катализаторы ферменты участвуют в тысячах превращений, происходящих в живой клетке и составляющих основу ее метаболизма. Особое значение имеют такие универсальные ферментные системы, как ДНК- и РНК-полимеразы, разнообразные аденозинтрифосфатазы (АТФазы), аденилатциклазы. В целом группа белков-ферментов изучена сравнительно хорошо, причем существенно то, что в процессе их исследования были сформулированы общие принципы и разработаны методы структурно-функционального анализа белковых веществ.

Схема 1. Биологические функции белков.



Среди *гормонов* белками являются инсулин, секретируемый поджелудочной железой, паратиреоидный гормон щитовидной железы, а также ряд гормонов гипофиза — гормон роста, липотропин, пролактин, гонадотропин, лютеинизирующий и фолликулостимулирующий гормоны, тиреотропин; белковую природу имеют и некоторые, пока мало изученные гормоны кишечника. Значительное число известных гормонов являются пептидами — окситоцин, вазопрессин, аденокортикотропный гормон, α - и β -меланоцитстимулирующие гормоны (гипофиз), глюкагон (поджелудочная железа), гастрин, секретин и холецистокинин (желудочно-кишечный тракт), кальцитонин (щитовидная железа), тканевые гормоны брадикинин и ангиотензин, вещества гормонального характера глутатион и офтальмовая кислота и др.

Схема 2. Биологические функции пептидов.



К гормонам близко примыкают так называемые *рилизинг-факторы* гипоталамуса (либерины), а также соответствующие ингибиторы, представляющие собой сравнительно небольшие пептиды; их основная функция заключается в контроле секреции гормонов гипофиза.

Здесь уместно упомянуть и недавно открытые *нейропептиды мозга* — энкефалины, эндорфины, пептиды памяти, сна и т. п. Установлено, что эти пептиды образуются из более сложных белковых предшественников путем процессинга. Быстрый рост числа вновь обнаруживаемых соединений такого типа свидетельствует о важности химических механизмов в регуляции поведения и высшей нервной деятельности.

Среди белково-пептидных веществ имеется много *антибиотиков*. К ним относятся колицины, итурин, актиноксантин, неокарцино-статин и ряд других, пока плохо охарактеризованных соединений. Многочисленную группу составляют антибиотики-пептиды: грамицидин S, грамицидины А, В и С, тироцидины, бацитрацины, полимиксины, антибиотики-депсипептиды — валиномицин, энниатины, актиномицин D, низин, этамицин, эхиномицин; сюда же могут быть отнесены пенициллины, цефалоспорины, бластолизин и т. п.

Наиболее мощные из известных *токсиков* являются белками микробного происхождения. По уровню токсичности не имеют себе равных ботулинический, столбнячный и дифтерийный токсины и ряд энтеротоксинов. Среди растительных токсичных белков хорошо



Бойль (Boyle) Роберт (1627—1691), английский химик и физик. Образование получил в колледже Итона и Женевской академии. Развил атомистическую теорию, впервые дал научное определение химического элемента, указал на принципиальное значение эксперимента в химических исследованиях, заложил основы химического анализа, сформулировал один из газовых законов (закон Бойля — Мариотта).



Фуркруа (Fourcroy) Антуан Франсуа де, (1755—1809), французский химик, иностранный почетный член Петербургской АН (1802). Окончил Парижский университет (1780). Основные работы посвящены систематике химических соединений. Участвовал в разработке рациональной химической номенклатуры. Сторонник антифлогистической теории в химии. Установил химическую природу мочевины (1799, совместно с Л. Вокленом).



Дальтон (Dalton) Джон (1766—1844), английский физик и химик, основоположник химической атомистики. Образование получил самостоятельно, с 1793 г. преподавал в Новом колледже в Манчестере. Установил закон кратных отношений (1803), ввел понятие «атомный вес», первым определил атомные массы многих элементов. Открыл газовые законы, названные его именем (1801 и 1803). Впервые описал дефект зрения, названный дальтонизмом (1794).

изучены рицин (клещевина) и абрин. Белками являются и многочисленные зоотоксины змей, пауков, ракообразных. Среди пептидов необходимо упомянуть токсины пчел, шершней, ос, морских анемонов и других морских организмов, ядовитые начала бледной поганки фаллоидин и аманитин, их антагонист антаманид, грибковый метаболит малформин и др.

К группе пептидных *алкалоидов* принадлежат действующие начала спорыньи — эрготамин, эргозин, эргокрестин, а также франгулин, скутианин, цицифин, пандамин.

Большую группу составляют так называемые *транспортные белки*, т. е. белки, участвующие в переносе различных веществ, ионов и т. п. К ним обычно относят цитохром с, участвующий в транспорте электронов, гемоглобин, гемоцианин и миоглобин, переносящие кислород, а также сывороточный альбумин (транспорт жирных кислот в крови), β -липопротеин (транспорт липидов), церулоплазмин (транспорт меди в крови), липид-обменивающие белки мембран. В последнее время эта группа пополнилась мембранными белками, выполняющими функции ионных каналов, — здесь необходимо упомянуть белковые компоненты полосы В-3, ответственные за транспорт анионов через эритроцитарную мембрану, белки Na^+ -, Ca^{2+} - и K^+ -каналов возбудимых мембран. К «транспортным» пептидам резонно отнести канал-образующие соединения типа аламетидина и грамицидинов А, В и С, а также пептидные антибиотики — ионофоры ряда валиномицина, энниатина и др.

Под понятием *защитные белки* объединяются вещества белковой природы, которые помогают организму преодолевать патологические состояния или бороться с возбудителями заболеваний (главным образом, в случае высших организмов). Сюда относятся, в частности, иммуноглобулины, антигены главного комплекса тканевой совместимости, антиген-распознающие рецепторы лимфоцитов, лимфокины, монокины, а также белки системы комплемента; вполне логично рассматривать здесь и антивирусные агенты типа интерферона, факторы некроза опухолей и др. В эту же группу могут быть включены и белки, вызывающие свертывание крови (фибриноген, фибрин, тромбин).

Среди *структурных белков* необходимо прежде всего упомянуть макромолекулы, составляющие остов многих тканей и органов и определяющие их механические свойства: коллаген соединительных тканей, костей и суставов, эластин связок, α -кератин кожи, волос, ногтей, рогов и перьев, склеротин наружного скелета насекомых, фиброин шелка. Эта группа может быть дополнена протеогликанами клеточных стенок бактерий, белками оболочек вирусов, некоторыми мембранными и рибосомальными белками. Отметим, что приписываемая многим белкам чисто структурная функция часто связана лишь с недостаточным уровнем знаний об их других, более специфических функциях.

Родственный класс составляют так называемые *двигательные белки*. Из них наиболее известны белки сократительного аппарата мышц — актин и миозин. Их разновидностью являются динеин ресничек и жгутиков простейших, спектрин мембран эритроцитов, нейростенин пресинаптических мембран и т. п. Сюда можно отнести и белки бактерий, ответственные за движение в градиенте концентраций различных веществ (хемотаксис), в частности мальтозу-связывающий белок *E.coli*.

Из *рецепторных белков* следует, безусловно, упомянуть родопсин зрительного аппарата животных и родственный ему бактериородопсин галофильных бактерий, которые способны воспринимать и преобразовывать световые сигналы. В настоящее время интенсивно изучаются рецепторы многочисленных гормонов, а также нейропептидов мозга, рецепторы нейромедиаторов (например, ацетилхоли-

новый рецептор постсинаптических мембран), рецепторы клеточной поверхности эритроцитов, лимфоцитов и других клеток.

Менее определена функция группы *регуляторных белков и пептидов*, поскольку, в известной степени, эту роль выполняют любые белки. Сюда относят белково-пептидные вещества, не вошедшие в состав вышеупомянутых групп, но весьма важные для функционирования отдельных звеньев клеточного механизма, например гистоны и репрессоры, регулирующие активность генов, «воротные» белки мембранных каналов, рибосомальные белковые факторы инициации и элонгации (см. с. 422). К этой группе можно отнести и встречающиеся в мышечной ткани природные пептиды карнозин и ансерин.

Наконец, следует упомянуть группу *запасных белков*. В ее состав входят овальбумин яичного белка, казеин молока, глиадин пшеницы, зеин ржи, гордеин ячменя, а также ферритин («депо» железа в селезенке) и др.

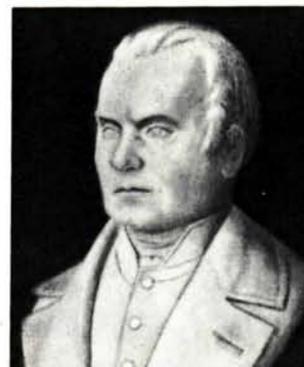
Белки — важнейшая составная часть пищи человека и корма животных. Человеку необходимо в день в среднем 70 г белка. Главным источником пищевого белка являются сельскохозяйственные продукты — мясо, молоко, пшеница, рожь, кукуруза, рис, соя, горох, фасоль, различные овощи и фрукты; значительные количества белка содержат рыба и продукты моря. Основными характеристиками пищевого или кормового белка принято считать его перевариваемость и сбалансированность по аминокислотному составу; это устанавливается путем сравнения данного белка со стандартным препаратом, например казеином или лактальбумином, в наилучшей степени отвечающим физиологическим потребностям человека и животных. В то же время известно, что многие белки содержат недостаточное количество некоторых незаменимых аминокислот — лизина, триптофана, метионина, вследствие чего их питательная ценность резко снижается; примером может служить белок кукурузы, обнаруживающий дефицит по лизину. В этом случае целесообразно для компенсации добавлять к рациону рассчитанные количества недостающего компонента — в виде свободной аминокислоты либо в виде другого белка, специфически богатого данным компонентом. Таким путем, в частности, готовят искусственные питательные смеси, применяемые для лечебного питания во многих странах.

Незаменимые аминокислоты не синтезируются в организме животных и должны поступать извне — с пищей. К ним относятся: гистидин, изолейцин, лейцин, лизин, метионин, фенилаланин, треонин, триптофан, валин и аргинин. Организм некоторых животных обладает способностью синтезировать, хотя и недостаточно быстро, аргинин, необходимый для нормального роста.

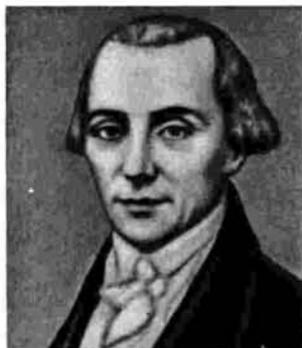
В настоящее время на земном шаре ощущается острый белковый дефицит, связанный с недостаточным производством и неравномерным распределением продуктов питания, а также быстрым ростом народонаселения. Эта проблема, особенно актуальная в развивающихся странах Азии и Африки, привлекает пристальное внимание многих государств и международных организаций. Лучшим и наиболее естественным путем увеличения производства пищевых продуктов является повышение продуктивности сельскохозяйственного производства во всех регионах нашей планеты на основе внедрения новейших достижений науки. Большое значение приобретает использование нетрадиционных источников белка — к ним можно отнести огромные биологические ресурсы Мирового океана, в частности криль, планктон и др. В этой связи несомненные перспективы открывает получение белка с помощью микробиологического синтеза: исходным сырьем здесь могут служить углеводороды нефти, чистые парафины, природный газ, отходы деревообрабатывающей и целлюлозно-бумажной промышленности, меласса, синтетические



Гей-Люссак [Gay-Lussac] Жозеф Луи (1778—1850), французский химик и физик, иностранный почетный член Петербургской АН (1829). Образование получил в Политехнической школе в Париже (1806), ученик К. Бертолле. Открыл газовые законы, названные его именем. Получил синильную кислоту (1811), построил первые диаграммы растворимости (1819). Усовершенствовал методы элементного и объемного химических анализов. Улучшил технологию производства серной кислоты (башня Гей-Люссака).



Браконно [Braconnot] Анри (1780—1855), французский химик. Образование получил в Страсбургском и Парижском университетах. Основное направление работ — химия природных соединений. Впервые успешно осуществил выделение белков из растительных и животных тканей. Открыл в продуктах гидролиза белка глицин (1820).



Воклен [Vauquelin] Луи Никола (1763—1829), французский химик. Образование получил самостоятельно. Совместно с А. Фуркруа выяснил химическую природу мочевины (1799). Вместе с П. Робике открыл аспарагин (1805). Открыл и выделил в свободном состоянии хром и бериллий (1798).



Мульдер [Mulder] Геррит Ян (1802—1880) — голландский химик и врач, создатель первой теории строения белковых веществ. В 1840—1862 гг. — профессор Утрехтского университета. Предложил формулы протеина и индивидуальных белков (1838), построенные на основании протеиновой теории. Впервые осуществил синтез диметилбарбитуровой кислоты (1879), получил фиброин из шелка (1837).

спирты (метанол, этанол), метан и т. п. Мощная микробиологическая промышленность, производящая белково-витаминные концентраты в качестве добавок в корм сельскохозяйственным животным, создана в Советском Союзе.

Белку и его компонентам — аминокислотам — отводится центральное место и в проблеме создания искусственной пищи, над решением которой работают многие лаборатории мира.

Исторический очерк. Свое название белки получили от яичного белка, который с незапамятных времен использовался человеком как составная часть пищи. Согласно описаниям Г. Плиния Старшего, уже в Древнем Риме яичный белок применялся и как лечебное средство. Однако подлинная история белковых веществ начинается тогда, когда появляются первые сведения о свойствах белков как химических соединений (свертываемость при нагревании, разложение кислотами и крепкими щелочами и т. п.). Среди белков животного происхождения, вслед за яичным белком, были охарактеризованы белки крови. Образование сгустков крови при ее свертывании описано еще основателем учения о кровообращении У. Гарвеем; позднее на этот факт обратил внимание и Р. Бойль. Среди растительных белков пальма первенства принадлежит нерастворимой в воде клейковине из пшеничной муки, которую впервые получил Я. Беккари. В своих работах, опубликованных в «Комментариях Болонского института наук и искусств» в 1728 г., он отметил сходство клейковины с веществами животной природы, почему и называл ее *Gluten vegetabile*.

Впервые термин *белковый* (*albumineise*) применительно ко всем жидкостям животного организма использовал, по аналогии с яичным белком, французский физиолог Ф. Кене в 1747 г., и именно в таком толковании термин вошел в 1751 г. в «Энциклопедию» Д. Дидро и Ж. Д'Аламбера.

С этого периода исследования, связанные с получением белков, приобретают систематический характер. В 1759 г. А. Кессель-Майер, а несколько позднее И. Руэль описали выделение клейковины из различных растений и охарактеризовали ее свойства. В 1762 г. А. Халлер исследовал процесс образования и свертывания казеина, а в 1777 г. А. Тувенель, работавший тогда в Петербурге, называет творог белковой частью молока (*partie glutineuse*). Важнейший этап в изучении белков связан с работами французского химика А. Фуркруа, который рассматривал белки как индивидуальные вещества и доказал единую природу белковых веществ, выделенных из растительных и животных источников. Для трех главных белковых компонентов крови он предложил названия альбумин, желатин и фибрин. В 1780 г. Ф. Вассерберг относит к телам белковой природы хрусталик глаза.

К началу XIX столетия появляются первые работы по химическому изучению белков. Уже в 1803 г. Дж. Дальтон дает первые формулы белков — альбумина и желатина — как веществ, содержащих азот. В 1810 г. Ж. Гей-Люссак проводит химические анализы белков — фибрина крови, казеина и отмечает сходство их элементного состава. Решающее значение для понимания химической природы белков имело выделение при их гидролизе аминокислот. Вероятно, первым это сделал А. Браконно в 1820 г., когда, действуя на белки серной кислотой, при кипячении он получил «клеевой сахар», или гликокол (глицин), при гидролизе фибрина из мяса — лейцин и при разложении шерсти — также лейцин и смесь других продуктов гидролиза. Первой открытой аминокислотой был, видимо, аспарагин, выделенный Л. Вокленом из сока спаржи *Asparagus* (1806). В это же время Ж. Пруст получил лейцин при разложении сыра и творога. Затем из продуктов гидролиза белка были выделены многие другие аминокислоты (табл. 1).

Первая концепция строения белков принадлежит голландскому химику Г. Мульдеру (1836). Основываясь на теории радикалов, он сформулировал понятие о минимальной структурной единице, входящей в состав всех белков. Эту единицу, которой приписывался состав $2C_8H_{12}N_2 + 50$, Г. Мульдер назвал протеином (Pr), а свою концепцию — теорией протеина.

Позднее состав протеина был уточнен — $C_{40}H_{62}N_{10}O_{12}$; дополнительно к протеиным единицам некоторые белки содержали серу и фосфор. Формула белков, предложенная Мульдером в 1838 г., выглядела так:

белок сыворотки крови	10Pr S ₂ P
белок куриных яиц	10Pr SP
фибрин	10Pr SP
казеин	10Pr S
клейковина растений	10Pr S ₂
кристаллин (из хрусталика глаза)	15Pr

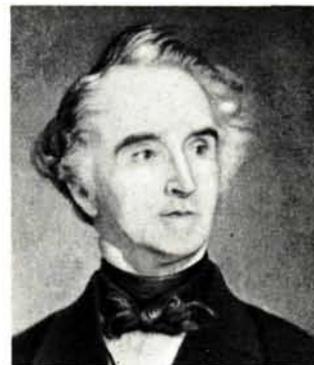
В частности, состав ногтей и лошадиных копыт изображался как $C_{120}H_{186}N_{34}O_{36}S_4 = (C_{40}H_{62}N_{10})_2O_{12}N_4 + C_{40}H_{62}N_{10}(O_{12}S_2)_2$.

Г. Мульдер пользовался структурными формулами и для обозначения ряда физиологических процессов. В своем учебнике физиологической химии (1844) он рассматривал дыхание как окисление протеина, пищеварение — как перестройку белка с изменением содержания S, P, Ca и т. п.

Работы Г. Мульдера способствовали широкому распространению взглядов о единстве всех белков, их фундаментальном значении в мире живой природы.

В ходе проверки «теории протеина» были резко расширены химические исследования белков, и в этом приняли участие выдающиеся химики того времени Ю. Либих и Ж. Дюма. Ю. Либих, поддержавший в принципе идею протеиновой единицы, уточнил формулу протеина $C_{48}H_{72}N_{12}O_{14}$, Ж. Дюма предложил свой вариант — $C_{48}H_{74}N_{12}O_{15}$, однако Г. Мульдер отстаивал правильность составленной им формулы. Его поддерживал Й. Берцелиус, изложивший теорию протеина в качестве единственной теории строения белка в знаменитом учебнике химии (1840), что означало полное признание и торжество концепции Г. Мульдера.

Однако вскоре наступают трудные времена для теории протеина. В 1846 г. Н. Э. Лясковский, работавший в лаборатории Ю. Либиха, доказал неточность многих приведенных Г. Мульдером анализов. Свои сомнения в правильности теории публично высказал Ю. Либих, он планировал начать широкие исследования структуры белков и даже изучил продукты распада белковых веществ. Понимая весомость аргументов оппонентов, Г. Мульдер пытался корректировать формулу протеина ($C_{36}H_{50}N_8O_{10}$), но в конце концов уступил под натиском новых фактов и открытий. Теория протеина стала достоянием истории, однако ее значение непреходяще, ибо она стимулировала химические исследования белков, сделала белки одним из главных объектов бурно развивающейся химии природных веществ.



Либих (Liebig) Иоганн Юстус фон (1803—1873), немецкий химик, иностранный член-корреспондент Петербургской АН (1830). Образование получил в Боннском и Эрлангенском университетах, а также в Сорбонне у Ж. Л. Гей-Люссака; преподавал в Гиссенском и Мюнхенском университетах. Организовал (1825) первую в Германии химическую лабораторию, где стажировались многие известные химики. Основные работы — в области органической, физиологической, аналитической химии и агрохимии. Предложил методы количественного элементного анализа органических веществ (1828). Один из создателей теории радикалов. Обнаружил явление изомерии (1823).

Таблица 1

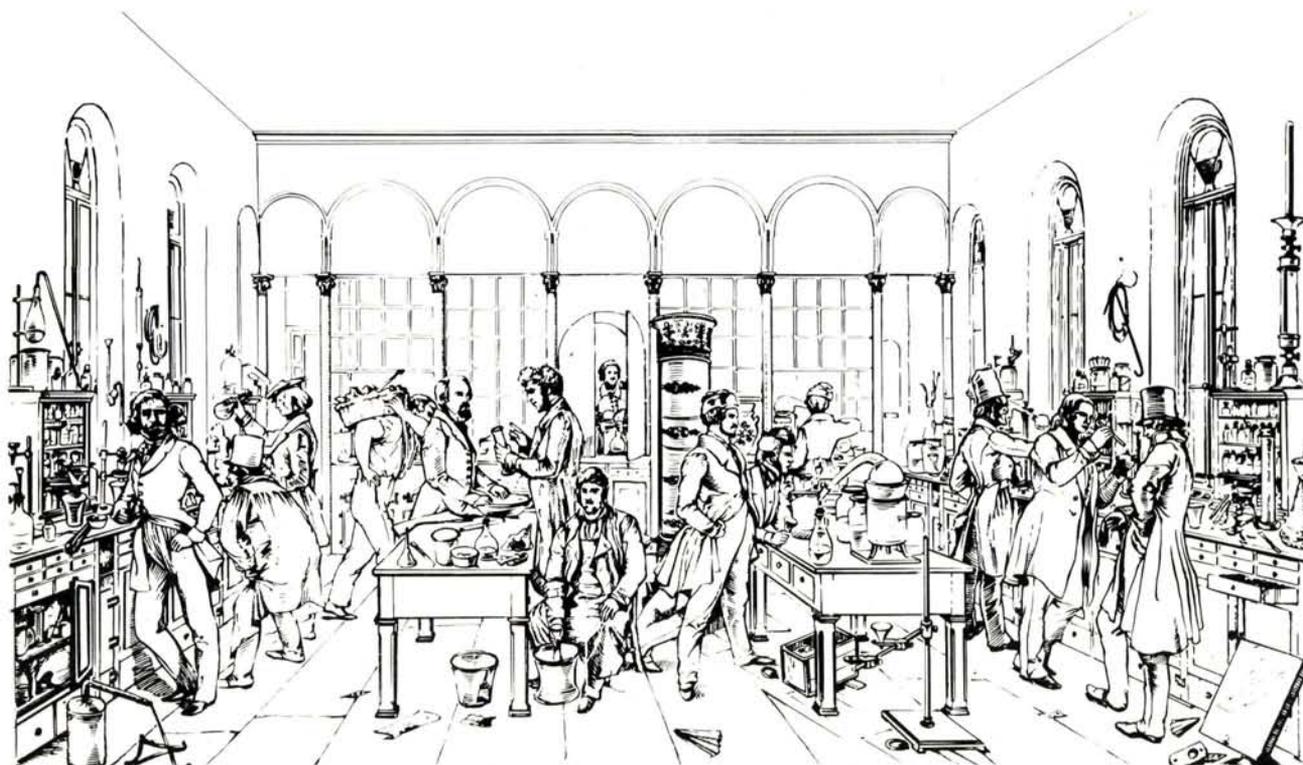
Открытие аминокислот в составе белков

Аминокислота	Год	Источник	Кто впервые выделил
Глицин	1820	Желатина	А. Браконно
Лейцин	1820	Мышечные волокна	А. Браконно
	1839	Фибрин шерсти	Г. Мульдер
Тирозин	1848	Казеин	Ф. Бопп
Серин	1865	Шелк	Э. Крамер
Глутаминовая кислота	1866	Растительные белки	Г. Риттхаузен
Аспарагиновая кислота	1868	Конглутин, легумин (ростки спаржи)	Г. Риттхаузен
Фенилаланин	1881	Ростки люпина	Э. Шульце, Й. Барбьери
Аланин	1888	Фиброин шелка	Т. Вейль
Лизин	1889	Казеин	Э. Дрексель
Аргинин	1895	Вещество рога	С. Гедин
Гистидин	1896	Стурин, гистоны	А. Кессель, С. Гедин
Цистин	1899	Вещество рога	К. Мёрнер
Валин	1901	Казеин	Э. Фишер
Пролин	1901	Казеин	Э. Фишер
Гидроксипролин	1902	Желатина	Э. Фишер
Триптофан	1902	Казеин	Ф. Гопкинс, Д. Кол
Изолейцин	1904	Фибрин	Ф. Эрлих
Метионин	1922	Казеин	Д. Мёллер
Треонин	1925	Белки овса	С. Шрайвер и др.
Гидроксизин	1925	Белки рыб	С. Шрайвер и др.

Для формирования современных представлений о структуре белка существенное значение имели работы по расщеплению белковых веществ протеолитическими ферментами. Одним из первых их использует Г. Мейснер. В 1850 г. К. Леман предлагает называть пептонами продукты разложения белков пепсином. Изучая этот процесс, Ф. Хоппе-Зайлер и Ш. Вюрц в 70-х годах прошлого столетия пришли к важному выводу, что пептоны образуются в результате гидролиза белков ферментом. Они были весьма близки к правильному толкованию таких экспериментов с позиций структурной химии, но, к сожалению, последнего шага на пути к теории строения белка сделать не сумели. Очень близок к истине был и А. Я. Данилевский, который справедливо утверждал, что белки построены из аминокислот и имеют полимерную природу; главной же структурной единицей он ошибочно считал биуретовую группировку RNHCONHCOR^1 .

Дальнейшие структурные исследования белка, а также основополагающие работы Т. Курциуса по синтезу пептидов привели в конце концов к формулированию (1902) пептидной гипотезы, согласно которой белки построены из аминокислот, соединенных пептидными связями $-\text{CO}-\text{NH}-$. Пептидная теория (Э. Фишер и В. Гофмейстер) получила полное подтверждение в дальнейших исследованиях. Изучение строения белков было поставлено на прочную научную основу.

Рис. 2. Лаборатория Ю. Либиха в Гиссене.

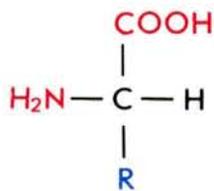


Строение белков и пептидов

Белки — высокомолекулярные природные полимеры, построенные из остатков аминокислот, соединенных амидной (пептидной) связью (—CO—NH—). Каждый белок характеризуется специфичной аминокислотной последовательностью.

По составу белки делятся на простые, состоящие только из аминокислотных остатков, и сложные. Сложные белки могут включать ионы металла (металлопротеины, или металлопротеиды), пигмент (хромопротеины, или хромопротеиды), образовывать прочные комплексы с липидами (липопротеины), нуклеиновыми кислотами (нуклеопротеины), а также ковалентно связывать остаток фосфорной кислоты (фосфопротеины), углевода (гликопротеины) или нуклеиновой кислоты (геномы некоторых вирусов).

Аминокислоты. Роль структурных элементов в белках выполняют α -аминокислоты, отличающиеся друг от друга строением боковых групп (боковых цепей), обозначенных R; в состав белков входят, как правило, аминокислоты в L-конфигурации.



Дюма [Dumas] Жан Батист Андре (1800—1884), французский химик, один из основоположников современной химии, иностранный член-корреспондент Петербургской АН (1845). Образование получил в Женевском университете, с 1841 г. — профессор Сорбонны и Высшей медицинской школы в Париже. Впервые ввел понятие гомологии. Открыл метод определения плотности паров веществ (1826), количественного определения азота в органических соединениях (1830). Установил состав ацетона, хлороформа, камфоры, эмпирическую формулу индиго (1841).

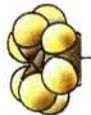
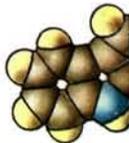
α -Аминокислоты в белках ковалентно соединены между собой пептидными связями, образованными карбоксильной группой одной аминокислоты и α -аминогруппой другой:

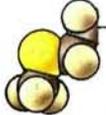
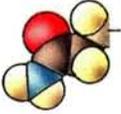
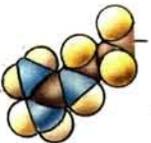
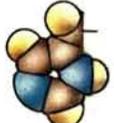


Белковая молекула может состоять из одной или нескольких полипептидных цепей, содержащих от 2 — 3 десятков до нескольких сотен аминокислотных остатков каждая.

Практически все белки построены из 20 α -аминокислот, структура которых приведена в таблице 2.

Структура α -аминокислот, наиболее часто встречающихся в белках

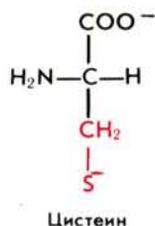
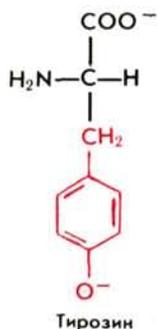
Аминокислота $R - CH(NH_2) - COOH$	Условные обозначения		Структурная формула	Строение боковой цепи (R)
	трехбуквенное	однобуквенное		
Глицин	Gly	G	$\begin{array}{c} H \\ \\ H - C - COO^- \\ \\ NH_3^+ \end{array}$	
ГИДРОФОБНЫЕ				
Аланин	Ala	A	$\begin{array}{c} H \\ \\ CH_3 - C - COO^- \\ \\ NH_3^+ \end{array}$	
Валин	Val	V	$\begin{array}{c} CH_3 \\ \\ CH - C - COO^- \\ \\ CH_3 \\ \\ NH_3^+ \end{array}$	
Лейцин	Leu	L	$\begin{array}{c} CH_3 \\ \\ CH - CH_2 - C - COO^- \\ \\ CH_3 \\ \\ NH_3^+ \end{array}$	
Изолейцин	Ile	I	$\begin{array}{c} CH_3 - CH_2 - CH - C - COO^- \\ \\ CH_3 \\ \\ NH_3^+ \end{array}$	
Пролин	Pro	P	$\begin{array}{c} H_2C \\ \\ C \\ \\ H_2C - N^+ - C - COO^- \\ \\ H_2 \\ \\ H \end{array}$	
Фенилаланин	Phe	F	$\begin{array}{c} \text{C}_6\text{H}_5 - CH_2 - C - COO^- \\ \\ NH_3^+ \end{array}$	
Триптофан	Trp	W	$\begin{array}{c} \text{Indole ring} - C - CH_2 - C - COO^- \\ \\ CH \\ \\ H \\ \\ NH_3^+ \end{array}$	

Аминокислота R — CH(NH ₂) — COOH	Условные обозначения		Структурная формула	Строение боковой цепи (R)
	трехбуквенное	однобуквенное		
Метионин	Met	M	$\text{CH}_3 - \text{S} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \underset{\substack{\text{NH}_3 \\ +}}{\overset{\text{H}}{\text{C}}} - \text{COO}^-$	
ГИДРОФИЛЬНЫЕ				
Серин	Ser	S	$\text{HO} - \text{CH}_2 - \underset{\substack{\text{NH}_3 \\ +}}{\overset{\text{H}}{\text{C}}} - \text{COO}^-$	
Треонин	Thr	T	$\text{CH}_3 - \underset{\text{OH}}{\text{CH}} - \underset{\substack{\text{NH}_3 \\ +}}{\overset{\text{H}}{\text{C}}} - \text{COO}^-$	
Аспарагин	Asn	N	$\text{NH}_2 - \underset{\text{O}}{\text{C}} = \text{CH}_2 - \underset{\substack{\text{NH}_3 \\ +}}{\overset{\text{H}}{\text{C}}} - \text{COO}^-$	
Глутамин	Gln	Q	$\text{NH}_2 - \underset{\text{O}}{\text{C}} = \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \underset{\substack{\text{NH}_3 \\ +}}{\overset{\text{H}}{\text{C}}} - \text{COO}^-$	
Лизин	Lys	K	$\text{H}_3\text{N}^+ - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \underset{\substack{\text{NH}_3 \\ +}}{\overset{\text{H}}{\text{C}}} - \text{COO}^-$	
Аргинин	Arg	R	$\text{H}_2\text{N} - \underset{\substack{\text{NH}_2 \\ +}}{\text{C}} = \text{NH} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \underset{\substack{\text{NH}_3 \\ +}}{\overset{\text{H}}{\text{C}}} - \text{COO}^-$	
Гистидин	His	H	$\text{HC} = \underset{\text{H}}{\text{C}} - \text{CH}_2 - \underset{\substack{\text{NH}_3 \\ +}}{\overset{\text{H}}{\text{C}}} - \text{COO}^-$ $\text{HN} = \underset{\text{H}}{\text{C}} = \text{NH}$	

Аминокислота R — CH(NH ₂) — COOH	Условные обозначения		Структурная формула	Строение боковой цепи (R)
	трехбуквенное	однобуквенное		
Аспарагиновая кислота	Asp	D	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ ^-\text{OOC} - \text{CH}_2 - \text{C} - \text{COO}^- \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$	
Глутаминовая кислота	Glu	E	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ ^-\text{OOC} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{C} - \text{COO}^- \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$	
Цистеин	Cys	C	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{HS} - \text{CH}_2 - \text{C} - \text{COO}^- \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$	
Тирозин	Tyr	Y	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{HO} - \text{C}_6\text{H}_4 - \text{CH}_2 - \text{C} - \text{COO}^- \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$	

В зависимости от характера боковых цепей они подразделяются на две группы: 1) аминокислоты с неполярными (гидрофобными) алифатическими или ароматическими R-группами, 2) аминокислоты с полярными (гидрофильными) R-группами.

К первой группе относятся 8 аминокислот: 6 с алифатической боковой цепью — аланин, валин, лейцин, изолейцин, метионин, пролин и 2 с ароматической — фенилаланин и триптофан. 7 аминокислот в боковой цепи содержат группировки, способные нести отрицательный или положительный заряд. Аспарагиновая и глутаминовая кислоты принадлежат к классу аминокислотных кислот, их β- и γ-карбоксильные группы при pH 7,0 заряжены отрицательно. К основным аминокислотам, боковые цепи которых могут нести положительный заряд, относятся лизин, аргинин и гистидин. ε-Аминогруппа лизина и гуанидиновая группировка аргинина при pH 7,0 протонированы. В щелочных условиях отрицательно заряженными могут быть боковые группы тирозина и цистеина.

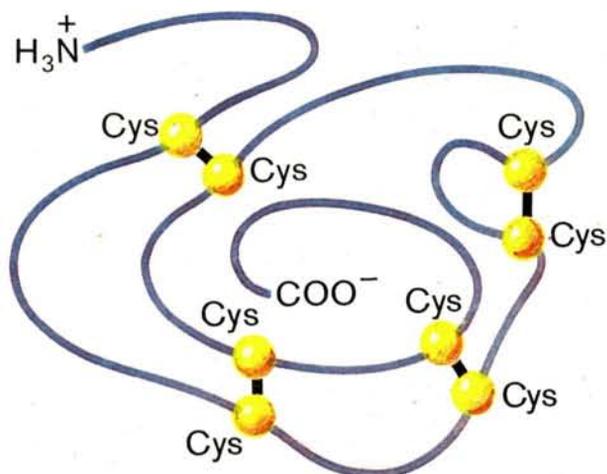


При pH 7,0 эти группы ионизированы частично. Характерной особенностью остатков цистеина является их способность подвергаться в составе молекулы белка самопроизвольному окислению с образованием «двойной» аминокислоты — цистина.



Данилевский Александр Яковлевич (1838—1923), русский биохимик, член-корреспондент Петербургской АН (1898). Окончил Харьковский университет (1860). Основные работы посвящены ферментам, химии белков и вопросам питания. Впервые разработал адсорбционный метод разделения ферментов поджелудочной железы. Предложил теорию строения белковых молекул.

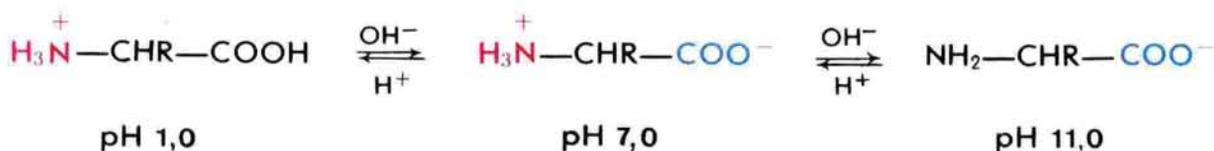
Дисульфидные связи остатков цистина ковалентно связывают участки одной или нескольких полипептидных цепей, образуя между ними поперечные дисульфидные мостики.



Помимо основных 20 аминокислот, некоторые белки содержат и их производные, образующиеся в процессе посттрансляционной модификации. Так, в фибриллярном белке коллагене и в некоторых растительных белках встречаются 4-гидрокси-пролин (HyPro) и 5-гидроксилизин (HyLys).

Фосфопротеины содержат остатки О-фосфосерина, реже — О-фосфотирозина, а в гликопротеинах ряд остатков серина, треонина или аспарагина — ковалентно присоединенные углеводные цепи. В гистонах ε-аминогруппы некоторых остатков лизина бывают моно-, ди- или триметилированы, иногда — ацелированы. В других белках встречаются также иодированные остатки тирозина, метилированные остатки аргинина и гистидина. Особенно часто необычные аминокислоты входят в состав пептидных антибиотиков.

α-Аминокислоты в водных растворах при нейтральных рН существуют преимущественно в виде диполярных ионов (цвиттер-ионов), у которых аминогруппы протонированы ($-\text{NH}_3^+$), а карбоксильные группы диссоциированы ($-\text{COO}^-$). Ионизация молекул аминокислот зависит от рН раствора:



Линдерстрём-Ланг (Linderstrøm Lang) Кай Ульрик (1896 — 1959), датский биохимик, иностранный член АН СССР (1958). Окончил Высшую техническую школу в Копенгагене (1919), с 1938 г. возглавлял Карлсбергскую лабораторию. Основные труды — в области физической химии белков; ввел понятие о трех уровнях организации белковой молекулы. Выделил кристаллическую протеиназу (1949).

Белки дают ряд цветных реакций, обусловленных наличием определенных аминокислотных остатков или общих химических группировок. Эти реакции широко используются для аналитических целей. Среди них широко известны нингидриновая реакция, позволяющая проводить количественное определение аминогрупп в белках, пептидах и аминокислотах, а также биуретовая реакция, применяемая для качественного и количественного определения белков и пептидов. (При нагревании белка или пептида, но не аминокислоты, с CuSO_4 в щелочном растворе образуется окрашенное в фиолетовый цвет комплексное соединение меди, количество которого можно определить спектрофотометрически.) Цветные реакции на отдельные аминокислоты используются для обнаружения пептидов, содержащих соответствующие аминокислотные остатки. Для идентификации гуанидиновой группы аргинина применяется реакция Сакагучи — при взаимодействии с α-нафтолом и гипохлоритом натрия гуанидины в щелочной среде дают красное окрашивание. Индольное кольцо триптофана может быть обнаружено реакцией Эрлиха — красно-фиолетовое окрашивание при реакции с п-диметиламинобензальдегидом в H_2SO_4 . Реакция Паули позволяет выявить остатки гистидина и тирозина, которые в щелочных растворах реагируют с диазобензолсульфонокислотой, образуя производные, окрашенные в красный цвет.

По предложению К. У. Линдерстрёма-Ланга, различают четыре уровня организации белковых молекул — первичную, вторичную, третичную и четвертичную структуры. Хотя эти категории в известной степени устарели, ими пока продолжают пользоваться. Последовательность аминокислотных остатков в полипептидной цепи называется первичной структурой. Термин «вторичная структура» относится к типу укладки полипептидных цепей. Наиболее часто встречаются типы — правая α-спираль, β-структура и β-изгиб. Под третичной структурой белка понимается расположение его

полипептидной цепи в пространстве. Термин «четвертичная структура» относится к белкам, в состав которых входит несколько полипептидных цепей (субъединиц), не связанных между собой ковалентно; такая структура отражает характер взаимного расположения этих субъединиц в пространстве.

Первичная структура белков и пептидов

Все белки различаются по своей первичной структуре. Потенциально возможное число таких структур практически неограниченно; так, для 15-членного пептида, состоящего из различных аминокислот, существует 20^{15} возможностей их взаимного расположения. Если же провести подобный расчет для среднего по величине белка с молекулярной массой 35 000 — 40 000, то окажется, что в живой природе все эти возможности не реализуются: общее число различных типов белков у всех видов живых организмов составляет величину порядка 10^{10} — 10^{12} .

Познание биологической функции и, в частности, молекулярного механизма физиологического действия белка невозможно без детального знания его строения. Установление первичной структуры белка служит основой для определения вторичной и третичной структур, выяснения расположения функциональных групп в его активном центре и открывает путь к познанию механизма его функционирования. Исследование первичной структуры «мутантных» белков позволяет на молекулярном уровне выяснить характер наследственных болезней. Данные по первичной структуре используются как один из показателей при установлении и проверке таксономических взаимоотношений между различными видами живых организмов и построении схемы биологической эволюции.

Принципиально первичную структуру белков можно определять путем непосредственного анализа аминокислотной последовательности или путем расшифровки нуклеотидной последовательности соответствующих генов с помощью генетического кода. Естественно, наибольшую надежность обеспечивает сочетание этих методов.

Исследование первичной структуры белка начинается с определения его молекулярной массы, аминокислотного состава, N- и C-концевых аминокислотных остатков. Поскольку пока не существует метода, позволяющего установить полную первичную структуру белка на целой молекуле, полипептидную цепь подвергают специфичному расщеплению химическими реагентами или протеолитическими ферментами. Смесь образовавшихся пептидных фрагментов разделяют и для каждого из них определяют аминокислотный состав и аминокислотную последовательность.

После того как структура всех фрагментов установлена, необходимо выяснить порядок их расположения в исходной полипептидной цепи. Для этого белок подвергают расщеплению при помощи другого агента и получают второй, отличный от первого набор пептидных фрагментов, которые разделяют и анализируют аналогичным образом.

Предположим, что исследуемый белок имеет последовательность, представленную на схеме. При действии на него трипсином гидролизуются связи Lys—Val и Arg—Ser, а при обработке бромцианом (BrCN) расщепляются связи Met—Tyr и Met—Ala.

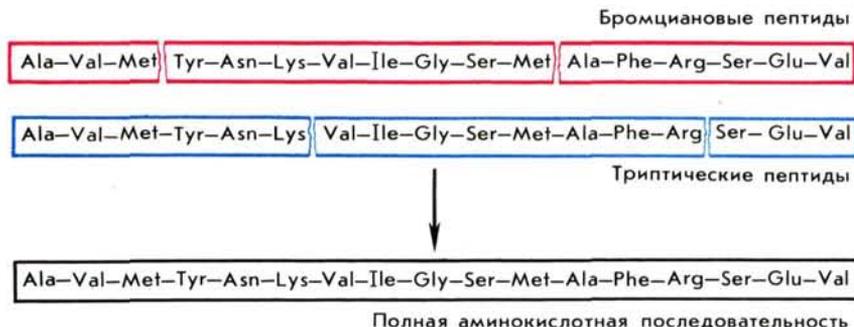


Лясковский Николай Эрастович (1811—1871), русский биохимик. Окончил медицинский факультет Московского университета, с 1855 г. — заведующий кафедрой химии Московского университета. Известен трудами в исследовании белков, впервые правильно установил эмпирические формулы фибрина и яичного и растительного альбумина.



Хоппе-Зайлер (Hoppe-Seyler) Эр Феликс (1825—1895), немецкий биохимик. Образование получил в университетах Галле и Лейпцига (1850) 1872 г. — профессор Страсбургского университета. Основные работы посвящены биохимии крови, изучению обмена веществ. Выяснил структуру основных пигментов крови. Кристаллический продукт превращения гемоглобина — гемохромоген.

Сопоставление аминокислотных последовательностей бромциановых и триптических пептидов позволяет однозначно выяснить их расположение вдоль полипептидной цепи белка. Обычно для определения полной структуры белка двух гидролизатов оказывается недостаточно, причем чем длиннее полипептидная цепь белковой молекулы, тем большее число различных типов расщеплений белка приходится использовать.



На завершающей стадии исследования первичной структуры белка проводится определение положения дисульфидных мостиков, если таковые имеются.

Определение аминокислотного состава

Анализ аминокислотного состава включает полный кислотный гидролиз исследуемого белка или пептида с помощью 5,7 н. соляной кислоты и количественное определение всех аминокислот в гидролизате. Гидролиз образца проводится в запаянных ампулах в вакууме при 110 °С в течение 24 ч. При этом полностью разрушается триптофан и частично серин, треонин, цистин и цистеин, а глутамин и аспарагин превращаются соответственно в глутаминовую и аспарагиновую кислоты. В то же время пептидные связи, образованные аминокислотными остатками с разветвленной боковой цепью (Val, Ile, Leu), из-за стерических препятствий гидролизуются частично. Особенно стабильны связи Val-Val, Ile-Ile, Val-Ile и Ile-Val.

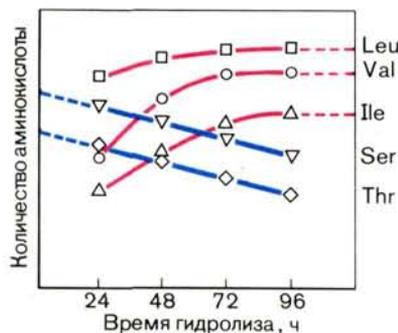


Рис. 3. Кинетика выхода некоторых аминокислот в процессе кислотного гидролиза.

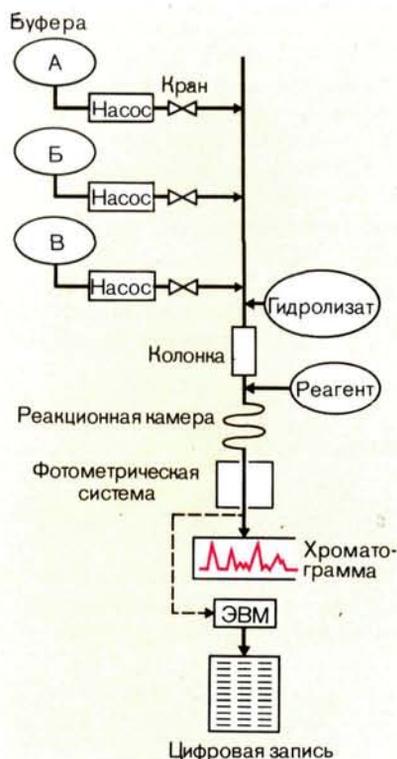
С целью более надежного определения аминокислотного состава белка проводится параллельный гидролиз в течение 24, 48, 72 и 96 ч и все пробы далее количественно анализируются. Для валина, лейцина и изолейцина берутся максимальные значения, а для серина и треонина полученные значения экстраполируются к нулевому времени (рис. 3).

При анализе содержания в белке триптофана вместо соляной кислоты для гидролиза используется 4 н. метансульфокислота. Триптофан можно идентифицировать спектрофотометрически или с помощью цветных реакций.

Обычно при определении аминокислотного состава белка ограничиваются анализом суммарного содержания глутамина и глутаминовой кислоты, аспарагина и аспа-

рагиновой кислоты, а их дифференциация проводится в процессе установления первичной структуры. Цистеин и цистин анализируются в виде цистеиновой кислоты или карбоксиметилцистеина.

Количественное определение аминокислот в гидролизате белка или пептида проводится с помощью аминокислотного анализатора — прибора, разработанного в 1958 г. С. Муром и У. Стейном. Принципиальная схема анализатора приведена на рисунке 4.

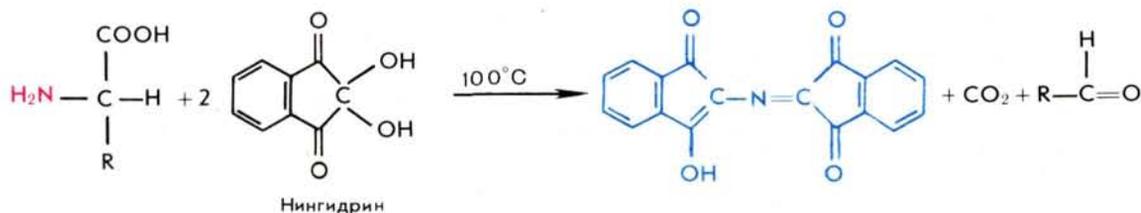


Мур [Мооре] Станфорд (1913—1982), американский биохимик. Окончил университет Вандербилта (штат Теннесси, 1935), с 1952 г.— профессор Рокфеллеровского института медицинских исследований. Основные труды посвящены химии белков, установил первичную структуру панкреатической рибонуклеазы. Сконструировал аминокислотный анализатор. Лауреат Нобелевской премии по химии (1972, совместно с К. Анфинсеном и У. Стейном).

Рис. 4. Схема аминокислотного анализатора.

Смесь аминокислот разделяется методом ионообменной хроматографии на колонке, заполненной сульфированной полистирольной смолой. Колонка промывается буферными растворами с последовательным повышением их pH и концентрации. Время удерживания каждой аминокислоты строго определено и зависит от степени ее ионизации.

Выходящий из колонки элюат смешивается с раствором нингидрина и в специальной ячейке нагревается до 100 °С. Аминокислоты, реагируя с нингидрином,



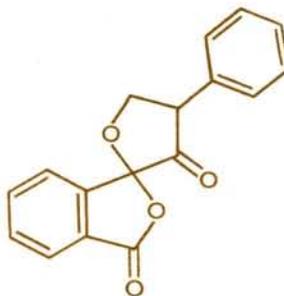


Стейн [Stein] Уильям Хоуард (1911—1980), американский биохимик. Окончил Гарвардский университет (1933), с 1938 г. работал в Рокфеллеровском институте медицинских исследований в Нью-Йорке. Основные труды — по исследованию строения белков. Совместно с С. Муром разработал количественный метод определения аминокислот, основанный на ионообменной хроматографии, и создал автоматический аминокислотный анализатор. Впервые установил (1960, совместно с С. Муром) первичную структуру рибонуклеазы. Лауреат Нобелевской премии по химии (1972, совместно с К. Анфинсеном и С. Муром).

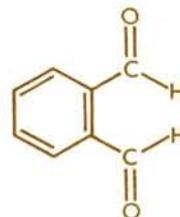
превращаются в аммиак, CO_2 и альдегид. Освобождающийся аммиак взаимодействует с другой молекулой нингидрина и дает окрашенное в фиолетовый цвет производное, имеющее максимум поглощения при 570 нм. Пролин при реакции с нингидрином образует продукт желтого цвета ($\lambda_{\text{макс.}} = 440$ нм). Интенсивность окраски получающихся в результате реакции продуктов, пропорциональная содержанию аминокислот в исследуемом гидролизате, измеряется с помощью спектрофотометра, показания которого регистрируются самописцем и могут поступать для обработки в миниЭВМ.

В современных аминокислотных анализаторах надежно детектируется 1 нмоль аминокислоты, время анализа составляет 1,5 — 2 ч и весь процесс автоматизирован (рис. 5).

Для повышения чувствительности вместо нингидрина в ряде анализаторов применяют флуорескамин или о-фталевый альдегид,



Флуорескамин



о-Фталевый альдегид

которые при реакции с аминокислотами образуют флуоресцирующие соединения. С использованием специального детектора в этом случае удастся регистрировать 10 — 50 пмоль аминокислоты.

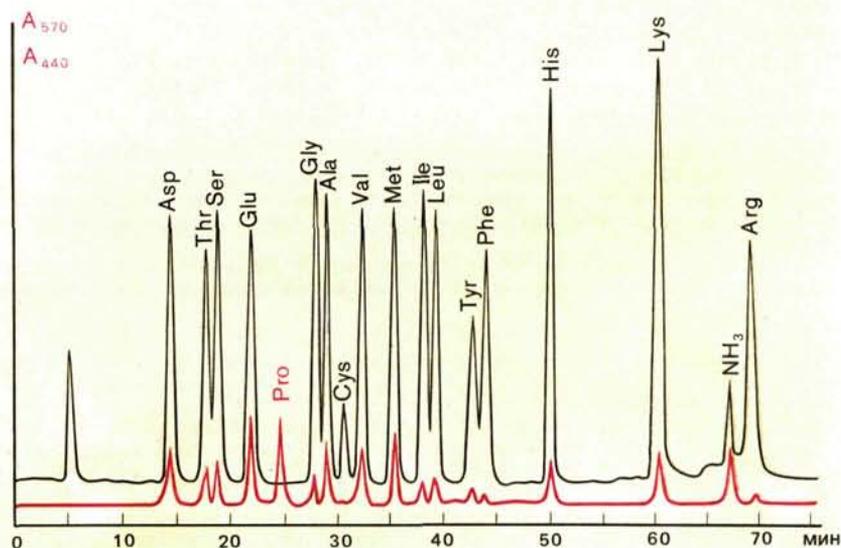


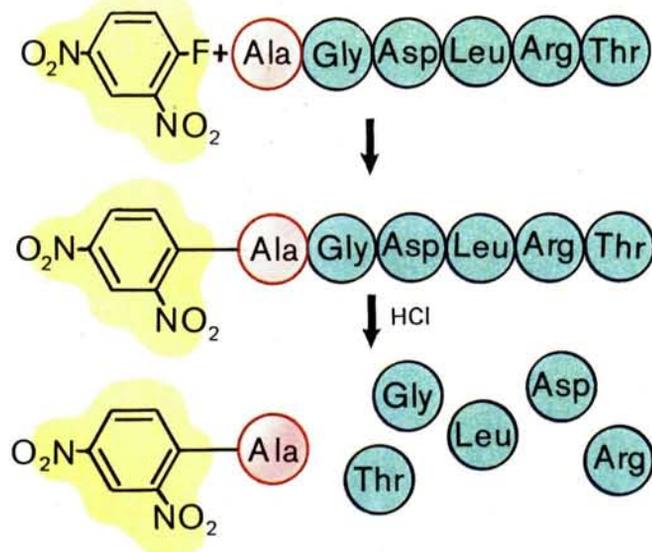
Рис. 5. Анализ стандартной смеси аминокислот (1 нмоль).

В полипептидной цепи белка с одной стороны расположен аминокислотный остаток, несущий свободную α -аминогруппу (аминоили N-концевой остаток), а с другой — остаток со свободной α -карбоксильной группой (карбоксильный, или C-концевой остаток). Анализ концевых остатков играет важную роль в процессе определения аминокислотной последовательности белка. На первом этапе исследования он дает возможность оценить число полипептидных цепей, составляющих молекулу белка, и степень гомогенности исследуемого препарата. На последующих этапах с помощью анализа N-концевых аминокислотных остатков осуществляется контроль за процессом разделения пептидных фрагментов.

Один из первых методов определения N-концевых аминокислотных остатков был предложен Ф. Сенгером в 1945 г. При реакции α -аминогруппы пептида или белка с 2, 4-динитрофторбензолом получается *динитрофенильное* (ДНФ) производное, окрашенное в желтый цвет. Последующий кислотный гидролиз (5,7 н. HCl) приводит к разрыву пептидных связей и образованию ДНФ-производного N-концевой аминокислоты. ДНФ-Аминокислота экстрагируется эфиром и идентифицируется методом тонкослойной хроматографии в присутствии стандартов.



Сенгер [Sanger] Фредерик (р. 1918), английский биохимик. Окончил Кембриджский университет (1939); с 1951 г. руководил отделом химии белка Медицинского исследовательского совета и одновременно с 1954 г. — лабораторией молекулярной биологии Кембриджского университета. Разработал основные методы исследования первичной структуры белков, установил химическое строение инсулина. Предложил эффективный метод определения нуклеотидной последовательности в полидезоксирибонуклеотидах. Лауреат Нобелевских премий по химии (1958; 1980, совместно с У. Гилбертом и П. Бергом).



Наибольшее применение для определения N-концевых остатков в настоящее время находит разработанный в 1963 г. В. Греем и Б. Хартли *дансильный метод*. Как и метод динитрофенилирования, он основан на введении в аминогруппы белка «метки», не удаляющейся при последующем гидролизе. Его первая стадия — реакция дансилхлорида (1-диметиламинонафталин-5-сульфохлорида) с непротонированной α -аминогруппой пептида или белка с образованием дансилпептида (ДНС-пептида).



Дансилхлорид



Хартли (Hartley) Брайен (р. 1926), английский биохимик. Окончил университет в Лидсе (1947), с 1981 г. — директор Центра биотехнологии Лондонского университета. Известен работами по химии пептидов и белков, разработал (совместно с В. Греем) дансильный метод определения N-концевых аминокислотных остатков.

На следующей стадии ДНС-пептид гидролизуются (5,7 н. HCl, 105 °С, 12 — 16 ч) и освобождается N-концевая α -ДНС-аминокислота. Кроме того, в результате дансирования боковых групп остатков лизина и тирозина могут получаться ϵ -ДНС-лизин и O-ДНС-тирозин.

ДНС-Аминокислоты обладают интенсивной флуоресценцией в ультрафиолетовой области спектра ($\lambda_{\text{возб.}} = 365 \text{ нм}$); обычно для их идентификации достаточно 0,1 — 0,5 нмоль вещества.

Некоторые ограничения дансильного метода связаны с использованием достаточно жесткого кислотного гидролиза; при этом имеет место разрушение остатков триптофана и дезаминирование остатков аспарагина и глутамина. В то же время связи, образованные остатками валина и изолейцина типа ДНС—Ile—Val—, ДНС—Val—Ile— и т. п., обладают повышенной устойчивостью к гидролизу, в результате чего наряду с ДНС-аминокислотами образуются ДНС-дипептиды, что осложняет идентификацию. В этом случае целесообразно увеличить продолжительность гидролиза до 2 — 3 суток. С другой стороны, для повышения выхода лабильных ДНС-серина, ДНС-треонина и ДНС-пролина следует сократить время гидролиза до 4 ч.

Долгое время единственным методом идентификации ДНС-аминокислот являлся метод микротонкослойной хроматографии. Были предложены разнообразные системы для разделения ДНС-аминокислот с помощью одномерной и двумерной хроматографии на тонких слоях целлюлозы, силикагеля (рис. 6) и полиамида. Однако сейчас более перспективным методом идентификации ДНС-аминокислот становится высокоэффективная обратнoфазовая жидкостная хроматография с использованием флуоресцентного детектора, позволившая повысить чувствительность дансильного метода до уровня 10 пмолей (рис. 7, 8).

Имеется ряд методов, с помощью которых можно определять как N-концевой аминокислотный остаток, так и N-концевую аминокислотную последовательность. К ним относится деградация по методу Эдмана и ферментативный гидролиз аминокептидазами. Эти методы будут подробно рассмотрены в разделе, посвященном определению аминокислотной последовательности пептидов.

Среди химических методов определения C-концевых аминокислотных остатков заслуживают внимания метод гидразинолиза, предложенный С. Акабори, и оксазалоновый метод В. Матсуо. В первом из них при нагревании пептида или белка с безводным гидразином при 100 — 120 °С пептидные связи гидролизуются с об-

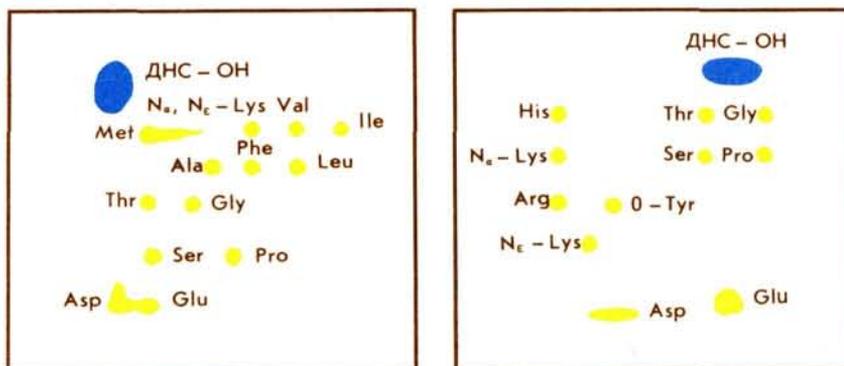
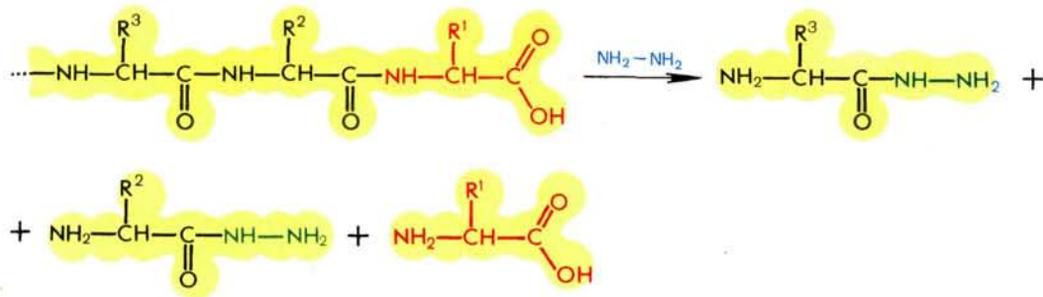


Рис. 6. Разделение ДНС-производных аминокислот двумерной хроматографией на тонком слое силикагеля в различных системах растворителей.

разованием гидразидов аминокислот. С-Концевая аминокислота остается в виде свободной аминокислоты и может быть выделена из реакционной смеси и идентифицирована.



Метод имеет ряд ограничений. При гидразинолизе разрушаются глутамин, аспарагин, цистеин и цистин; аргинин теряет гуанидиновую группировку с образованием орнитина. Гидразиды серина, треонина и глицина лабильны и легко превращаются в свободные аминокислоты, что затрудняет интерпретацию результатов.

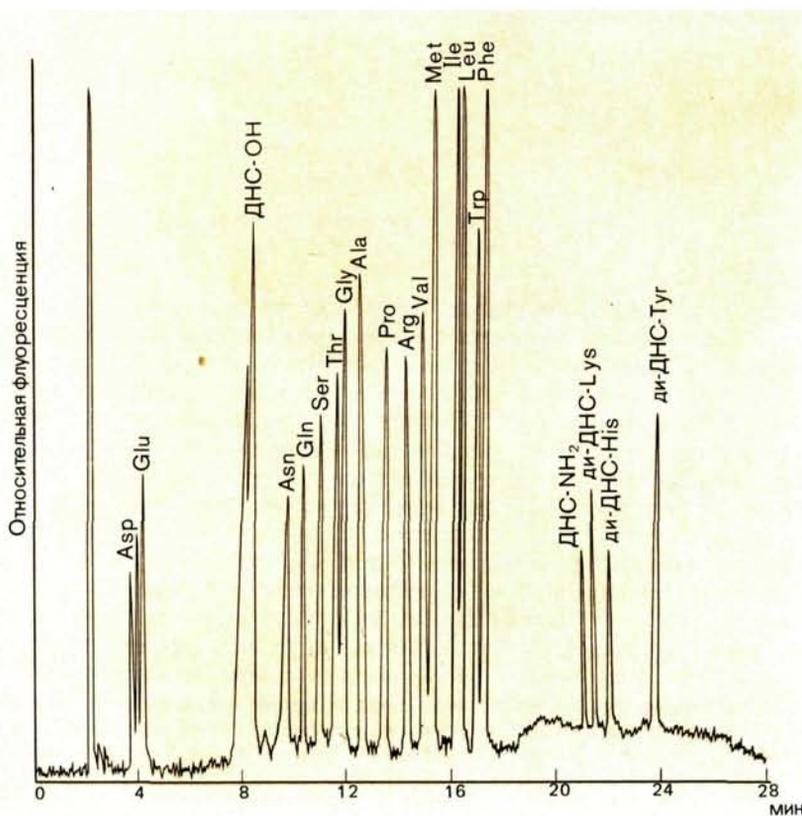
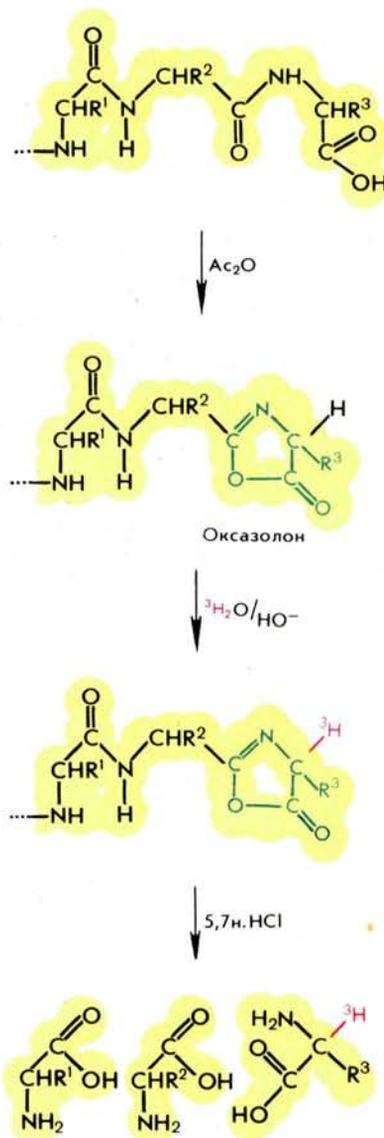


Рис. 7. Разделение ДНС-производных аминокислот (20 пмоль) методом ВЭЖХ на колонке с обращенной фазой («Ультрасфер ODS»).



Акабори [Akabori] Сиро (р. 1900), японский химик-органик и биохимик, иностранный член АН СССР (1966). Окончил Тохоку университет в Сендае (1925), с 1938 г.— профессор Осацкого университета. Основные труды посвящены выделению и анализу аминокислот, пептидов и белков. Предложил способ определения С-концевого аминокислотного остатка в белках или пептидах гидразинолизом.

Оксазолоновый метод, часто называемый методом тритиевой метки, основан на способности С-концевого аминокислотного остатка под действием уксусного ангидрида подвергаться циклизации с образованием оксазолона. В щелочных условиях резко увеличивается подвижность атомов водорода в положении 4 оксазолонового кольца, и он может быть легко обменян на тритий. Образующиеся в результате последующего кислотного гидролиза тритированного пептида или белка продукты реакции содержат радиоактивно меченную С-концевую аминокислоту. Хроматографирование гидролизата и измерение радиоактивности позволяют идентифицировать С-концевую аминокислоту пептида или белка.



В некоторых случаях тритий включается в остатки аспарагиновой и глутаминовой кислот, расположенные в середине пептидной цепи. С-Концевые остатки пролина в описанных условиях не образуют оксазолона, а в С-концевые остатки треонина и серина обычно не удается ввести достаточного количества радиоактивной метки, что, вероятно, связано с деградацией последних в присутствии уксусного ангидрида.

Чаще всего для определения С-концевых аминокислотных остатков используют ферментативный гидролиз карбоксипептидазами, позволяющий анализировать также и С-концевую аминокислотную последовательность.

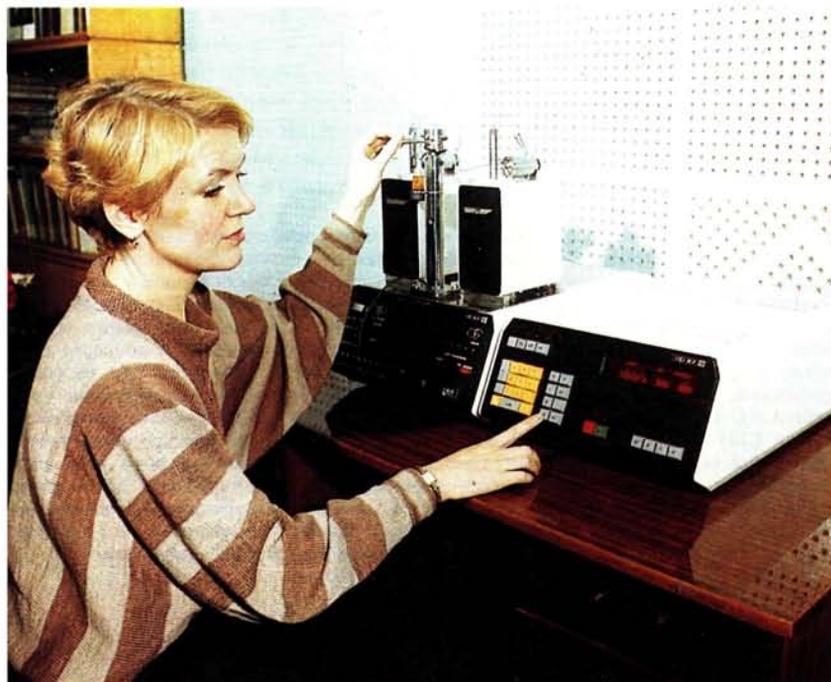


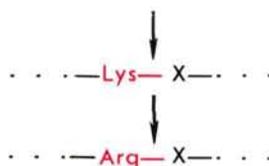
Рис. 8. Жидкостной микроколоночный хроматограф ХЖ-1311 с флуоресцентным детектором (НТО АН СССР, г. Ленинград).

Фрагментация полипептидной цепи

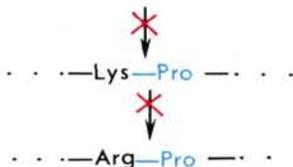
Необходимый этап в определении первичной структуры белка — расщепление белковой молекулы на пептидные фрагменты. Структурная химия белка располагает широким арсеналом химических и ферментативных методов фрагментации полипептидной цепи. Выбор того или иного метода определяется конкретными физико-химическими свойствами изучаемого белка и общим стратегическим планом проведения исследования. Химические методы обладают высокой селективностью, однако процесс расщепления протекает, как правило, с выходом, не превышающим 50%. Эти методы целесообразно использовать для получения крупных фрагментов. Возможности ферментативных методов гидролиза значительно шире, они дают как крупные, так и мелкие пептиды.

Ферментативные методы гидролиза. Наиболее широко используемым ферментом при установлении первичной структуры белков является *трипсин*. Коммерческий бычий трипсин получают активацией его предшественника — трипсиногена, выделяемого из секрета поджелудочной железы. Трипсин относится к классу сериновых протеиназ и проявляет наибольшую активность в диапазоне pH 7,0—9,0. Фермент обладает уникальной субстратной специфич-

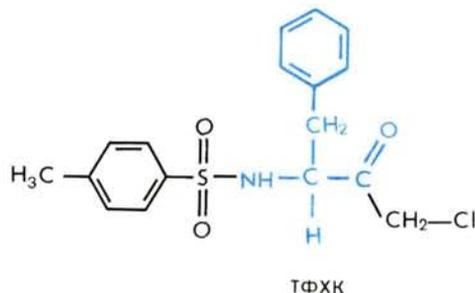
ностью, катализируя гидролиз связей, образованных карбоксильными группами только основных аминокислот — лизина и аргинина.



Гидролиз трипсином в оптимальных условиях происходит, как правило, с выходом, близким к 100%. Однако в ряде случаев на полноту и скорость протекания процесса оказывают влияние положение гидролизуемой связи в цепи и химическая природа боковых групп соседних аминокислотных остатков. Пептидные связи, рядом с которыми находятся свободные α -амино- или α -карбоксильные группы, гидролизуются сравнительно медленно. Так, лизин, занимающий N-концевое положение в рибонуклеазе и лизоциме, практически не отщепляется при гидролизе трипсином, а в В-цепи инсулина происходит только частичное расщепление связи лизина с С-концевым аланином. Как правило, соседство дикарбоновых аминокислот (Asp и Glu) и особенно цистеиновой кислоты или карбоксиметилцистеина затрудняет гидролиз пептидной связи трипсином. Однако практически во всех перечисленных случаях удается добиться достаточно полного гидролиза путем увеличения соотношения трипсин — субстрат или времени инкубации. Исключение составляют связи, образованные остатками лизина и аргинина с пролином (Lys — Pro и Arg — Pro), абсолютно устойчивые к действию фермента.

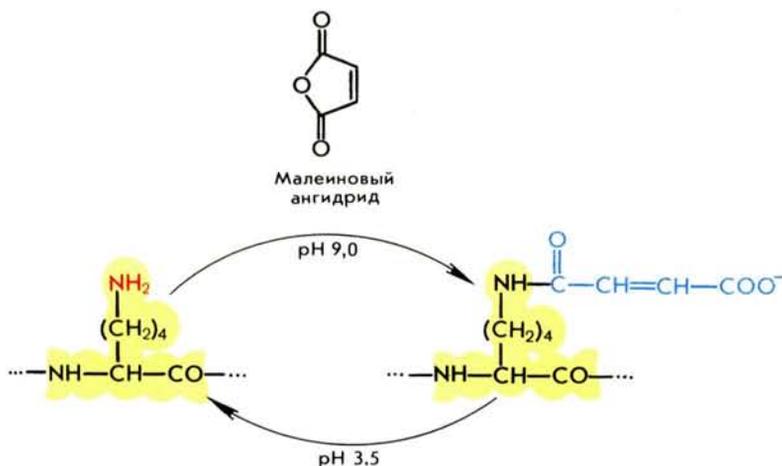


Трипсин обладает высокой избирательностью действия, и все же при достаточно большом времени инкубации и избытке фермента в ряде случаев наблюдается расщепление связей, включающих остатки ароматических аминокислот: тирозина, фенилаланина и триптофана. Коммерческие препараты трипсина могут содержать 0,05% примесей химотрипсина, поэтому во избежание аномальных разрывов пептидных связей применяют различные ингибиторы химотрипсина. Лучший из них — L-(1-тозиламидо-2-фенилэтил)хлорметилкетон (ТФХК) является аналогом ацилированного фенилаланина. Однако даже обработанный ТФХК трипсин иногда гидролизует типичные субстраты химотрипсина. По-видимому, проявление



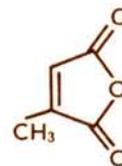
в некоторых случаях химотрипсиноподобной активности объясняется структурной и функциональной особенностью самого трипсина. Не исключено, что другим фактором, вызывающим неспецифичность действия фермента, является повышенная чувствительность некоторых пептидных связей, определяемая пространственной структурой субстрата.

Введение заместителей в боковые цепи лизина или аргинина препятствует гидролизу трипсином по остаткам модифицированных аминокислот и позволяет расщеплять белки избирательно только по остаткам аргинина или лизина соответственно. Особенно часто используется модификация остатков лизина с последующим гидролизом белка по остаткам аргинина. В качестве модифицирующих агентов применяются ангидриды дикарбоновых кислот. В результате реакции ацилирования происходит замена положительного заряда остатка лизина на отрицательный заряд полуамида дикарбоновой кислоты:

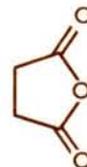


В зависимости от природы используемого реагента модификация остатков лизина может быть как обратимой, так и необратимой. Обратимое блокирование ϵ -аминогрупп позволяет осуществлять последовательное расщепление белковой молекулы трипсином: вначале только по остаткам аргинина, а затем, после разделения образовавшихся пептидов и удаления защитных групп, и по остаткам лизина.

Для обратимой модификации чаще всего используется реакция с малеиновым или цитраконовым ангидридами. Реакция ацилирования проводится при pH 8,5 — 9,0 и температуре 0 — +2 °C в присутствии 20-кратного избытка реагента. Малеиловые производные лизина стабильны при нейтральных и щелочных значениях pH, а в кислой среде (pH 3,5; 40 °C; 40 ч) гидролизуются, регенирируя свободную ϵ -аминогруппу. В этих условиях может происходить частичное дезамидирование белков, а также разрыв некоторых кислотолабильных связей, в частности между остатками аспарагиновой кислоты и пролина. Цитраконовая группа удаляется в более мягких условиях (pH 3,5; 20 °C; 4 ч), однако ее недостаток — пониженная устойчивость при щелочных значениях pH. Для необратимой модификации остатков лизина наилучшим агентом является янтарный ангидрид.

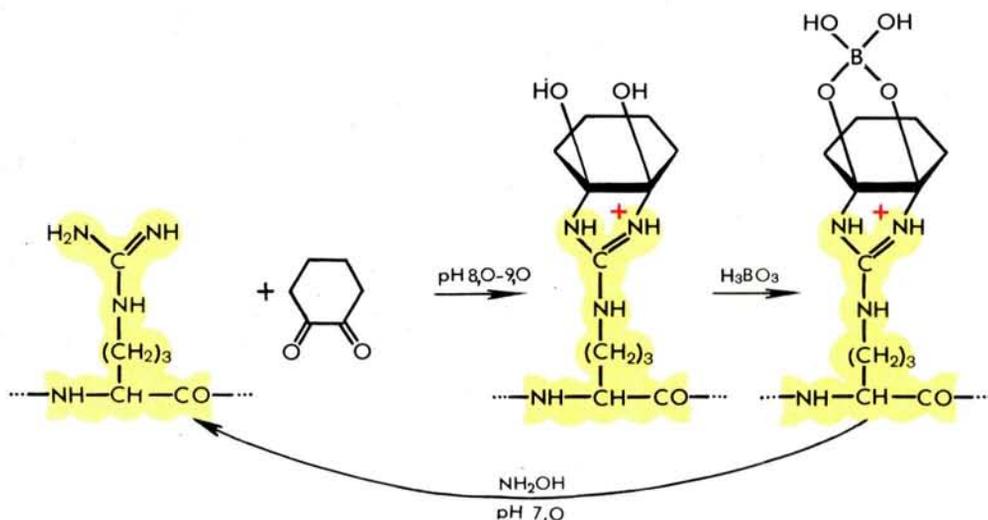


2-Метилмалеиновый (цитраконовый) ангидрид



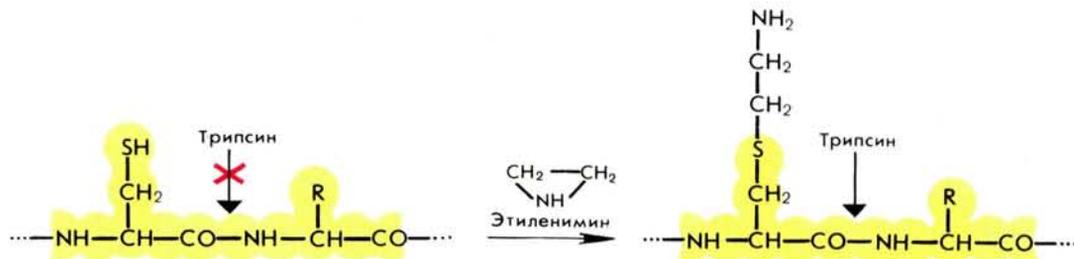
Янтарный ангидрид

Методы модификации остатков аргинина в белках основаны на конденсации гуанидиновой группы с различными дикетонами и диальдегидами. Наибольшее применение среди них находит реакция с 1,2-циклогександионом, предложенная в 1975 г. Л. Патти и Э. Смитом. Модификация протекает в мягких условиях (рН 8,0 — 9,0; 25 — 40 °С) в натрий-боратном буфере с образованием стабильного комплекса производного аргинина с боратом.



Модифицирующая группировка удаляется путем обработки 0,5 М гидроксиламином при рН 7,0, 37 °С, что дает возможность проводить последующее расщепление трипсином по освобождающимся остаткам аргинина.

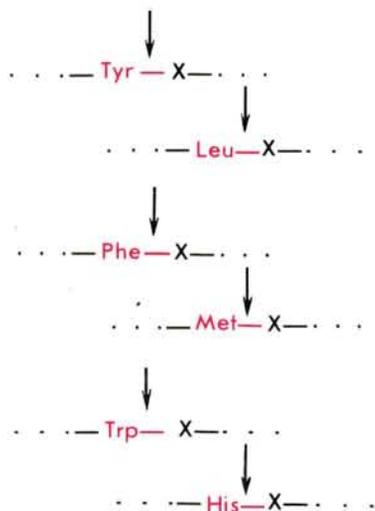
С помощью химической модификации можно также увеличивать число гидролизруемых трипсином связей. Для этой цели, в частности, используется аминоэтилирование остатков цистеина этиленмином (Л. Линдлей, 1956):



Пептидные связи, образованные карбоксильной группой S-(β-аминоэтил)цистеина, являющегося структурным аналогом лизина, способны расщепляться под действием трипсина, однако

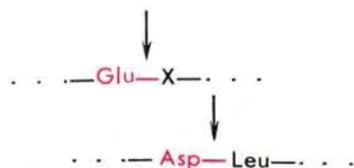
с меньшей скоростью, чем связи, образованные остатками лизина и аргинина. Более полного расщепления можно достичь увеличением концентрации фермента и продолжительности гидролиза.

Наряду с трипсином из поджелудочной железы выделяют другую сериновую протеиназу — *химотрипсин*. Используемый для структурных исследований α -химотрипсин А проявляет максимальную активность в диапазоне рН 7,8 — 9,0. Химотрипсин обладает гораздо более широкой специфичностью, чем трипсин. Фермент преимущественно катализирует гидролиз пептидных связей, образованных карбоксильными группами ароматических аминокислот — тирозина, фенилаланина и триптофана. С меньшей скоростью гидролизуются пептидные связи лейцина, метионина, гистидина. Скорость расщепления отдельных связей в белках и пептидах зависит от характера соседних аминокислотных остатков.



Аналогично трипсину химотрипсин обычно медленно гидролизует связи, расположенные в непосредственной близости от свободных α -амино- и α -карбоксильных групп. Наличие рядом с атакуемой химотрипсином связью отрицательного заряда (Glu, Asp, CMCys (карбоксиметилцистеин), CysSO₃H (цистеиновая кислота)) существенно снижает скорость гидролиза, а присутствие основных аминокислот (Lys и Arg) увеличивает степень расщепления. Чрезвычайно затруднен гидролиз пептидных связей, образованных иминогруппой пролина.

В последнее время при исследовании первичной структуры белков широкое применение находит протеиназа из *Staphylococcus aureus*, выделенная в 1972 г. Г. Р. Драпо, которая также относится к классу сериновых протеиназ. Фермент имеет два максимума протеолитической активности — при рН 4,0 и 7,8. Протеиназа из *S. aureus* с высоким выходом расщепляет пептидные связи, образованные карбоксильной группой глутаминовой кислоты.



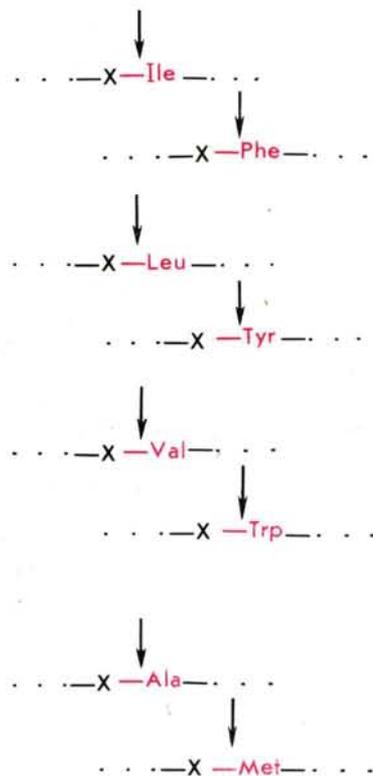
Смит [Smith] Эмиль Л. (р. 1911), американский биохимик, иностранный член АН СССР (1982). Окончил Колумбийский университет (1931), с 1963 г. — профессор Калифорнийского университета в Лос-Анжелесе. Один из ведущих специалистов по химии и биохимии белков, в первую очередь ферментов. Установил первичную структуру ряда гистонов, глутаматдегидрогеназы и др. белков. Автор (совместно с Р. Хиллом, И. Леманом и др.) широко известной книги «Основы биохимии».



Гросс [Gross] Эрхард (1928—1981), американский химик-органик. Образование получил в университетах Майнца и Франкфурта-на-Майне (Германия), с 1973 г. руководил лабораторией молекулярных структур Национального института здоровья (США). Основные работы посвящены химии пептидов. Предложил метод расщепления пептидов с помощью бромциана (совместно с Б. Виткопом).

В ряде случаев гидролизу подвергаются также связи, образованные остатком аспарагиновой кислоты. Остатки гидрофобных аминокислот (особенно лейцин), следующие за остатками аспарагиновой кислоты, благоприятствуют такому гидролизу. Как и в случае трипсина и химотрипсина, связи, в образовании которых участвует иминогруппа пролина, не расщепляются протеиназой из *S. aureus*. Свободная карбоксильная группа С-концевого аминокислотного остатка глутаминовой, аспарагиновой кислот и карбоксиметилцистеина, а также свободная α -аминогруппа значительно снижают скорость гидролиза, когда они располагаются рядом с атакуемой ферментом связью или даже отстоят от нее на один аминокислотный остаток.

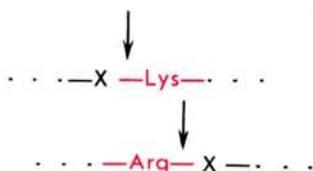
Термолизин, выделяемый из культуральной среды термофильной бактерии *Vacillus thermoproteolyticus*, относится к классу нейтральных протеиназ, содержащих цинк в качестве кофактора. Термолизин необычайно термостабилен: в течение часа он полностью сохраняет свою активность при 60 °С (рН 7,0) и теряет менее 50% активности при 80 °С. Фермент устойчив в 8 М растворе мочевины, 20%-ном растворе этанола или метанола. Максимальную активность он проявляет в диапазоне рН 7,0 — 9,0. В отличие от большинства протеолитических ферментов, специфичность термолизина определяется природой остатка, которому принадлежит аминокислотная группа гидролизуемой связи. Термолизин преимущественно расщепляет пептидные связи, включающие аминокислотные остатки с гидрофобной боковой цепью (Ile, Leu, Val, Phe, Tyr, Trp).



С меньшей скоростью гидролизуются связи, в образовании которых участвуют остатки аланина и метионина. Присутствие свободных карбоксильных и α -аминогрупп рядом с остатком гидрофобной аминокислоты несколько замедляет скорость гидролиза, а остаток пролина, следующий за остатком гидрофобной аминокислоты, препятствует гидролизу.

Трипсин, протеиназа из *S. aureus*, химотрипсин и термолизин являются ферментами, наиболее часто используемыми в настоящее время при установлении первичной структуры белков. Первые два из них, обладающие наиболее высокой специфичностью, применяются главным образом для первичного расщепления белковой молекулы. Термолизин и химотрипсин обычно служат инструментом для дополнительной фрагментации крупных пептидов — продуктов химического или ферментативного гидролиза белка. В то же время довольно часто они применяются и для первичного расщепления белков небольшой и средней молекулярной массы с целью получения «перекрывающихся» фрагментов.

Для избирательного расщепления молекулы белка по остаткам лизина или аргинина в последние годы довольно широко используются новые ферменты. Среди них так называемая лизин-специфичная протеиназа, выделяемая из грибов *Armillaria mellea*, и клострипаин из *Clostridium histolyticum*.



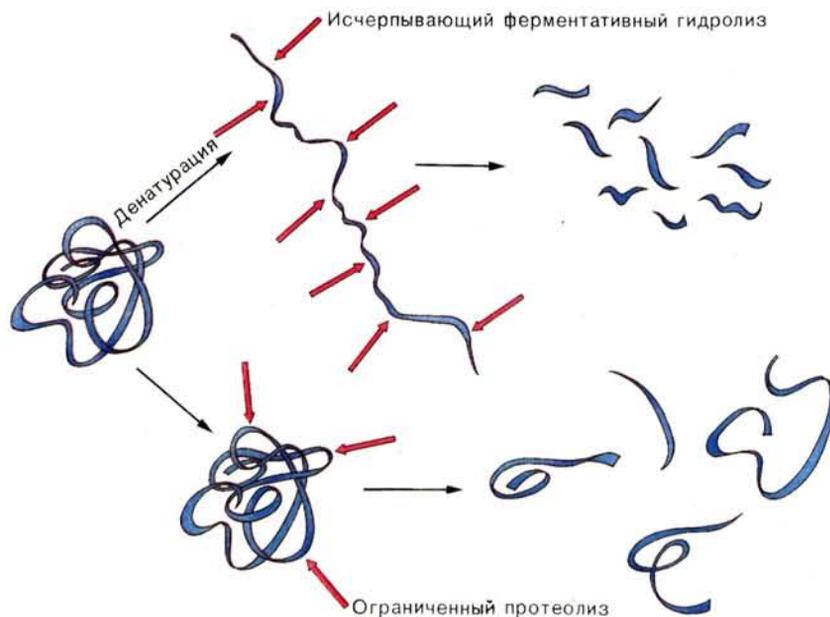
Лизин-специфичная протеиназа в основном катализирует расщепление пептидных связей, образованных α -аминогруппой лизина, а клострипаин предпочтительно гидролизует связи, образованные карбоксильной группой остатков аргинина.

В распоряжении исследователей имеется также большой набор менее специфичных протеолитических ферментов (пепсин, эластаза, субтилизин, папаин, проназа и др.). Эти ферменты используются в основном при дополнительной фрагментации пептидов. Их субстратная специфичность определяется природой аминокислотных остатков, не только образующих гидролизуемую связь, но и более удаленных по цепи.

Для исчерпывающего ферментативного гидролиза необходимо, чтобы белковая глобула находилась в денатурированном состоянии, т. е. все пептидные связи должны быть максимально доступными для атаки ферментом. В белке же, находящемся в нативной конформации, как правило, гидролизу подвергается только ограниченное число связей, расположенных на поверхности белковой молекулы, что приводит к образованию небольшого числа фрагментов. Этот процесс известен под названием *ограниченного протеолиза*. Реакции ограниченного протеолиза широко распространены в биологических системах, и с ними связано осуществление целого ряда физиологических процессов. В частности, к ним относятся процессы активации зимогенов протеиназ желудочно-кишечного тракта и сыворотки крови, процессинг многих гормонов и т. п.

Метод ограниченного протеолиза получил широкое распространение в структурно-функциональных исследованиях белков большой молекулярной массы. С помощью ограниченного протеолиза часто удается расщепить молекулу белка на небольшое число фрагментов и проводить дальнейшее исследование их строения, сводя таким образом одну сложную задачу к нескольким более простым.

Для реализации такого подхода необходимо выбрать протеолитический фермент и подобрать условия, при которых полипептидная цепь исследуемого белка будет гидролизоваться только по наиболее доступным пептидным связям. Важным условием ограниченного протеолиза является сохранение нативной конформации белка. Поэтому при выделении белка следует избегать действия денатурирующих агентов. Во многих случаях удастся расщепить молекулу белка на небольшое число фрагментов, если проводить гидролиз в условиях, которые снижают актив-



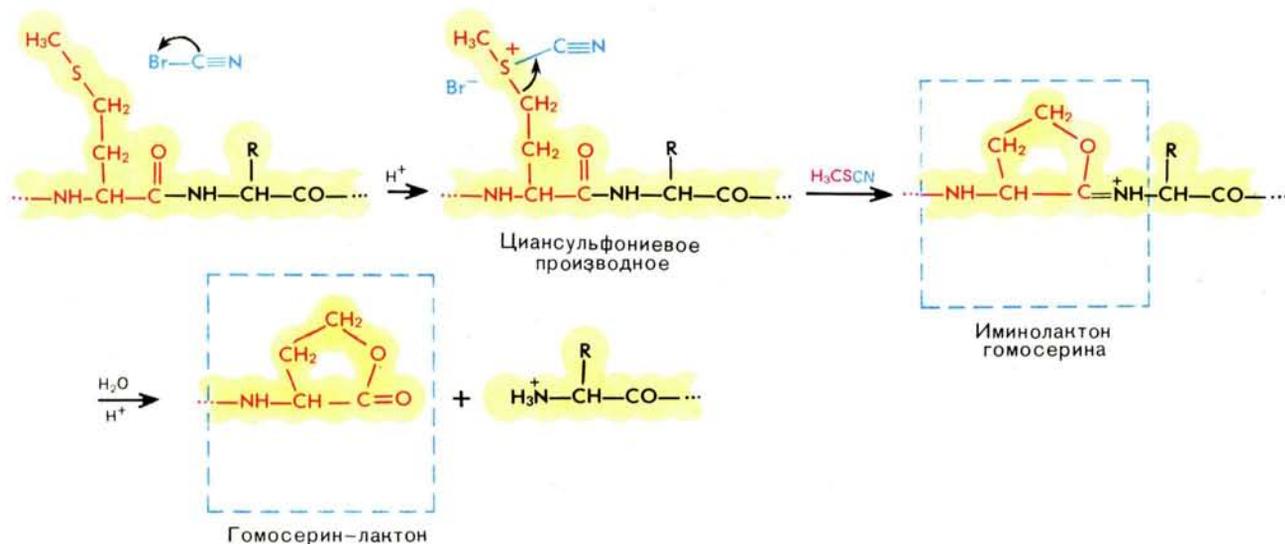
ность используемого протеолитического фермента. Обычно такими условиями являются небольшое фермент-субстратное соотношение, пониженная температура, а также значение pH, не соответствующее оптимуму действия фермента.

Так, при гидролизе основного белка миелина пепсином при pH 3,0, 37 °С и фермент-субстратном соотношении 1:50 наблюдается образование 17 фрагментов; при pH 3,0, 24 °С и фермент-субстратном соотношении 1:500 расщепление проходит главным образом по трем связям, а при pH 6,0, 24 °С и фермент-субстратном соотношении 1:500 расщепляется единственная связь Phe — Phe. Молекулу мембранного белка можно расщепить на небольшое число фрагментов, если подвергать протеолизу нативную мембрану со встроенным в нее белком. При этом под действием фермента способны расщепляться только пептидные связи, находящиеся на поверхности мембраны (см. с. 608).

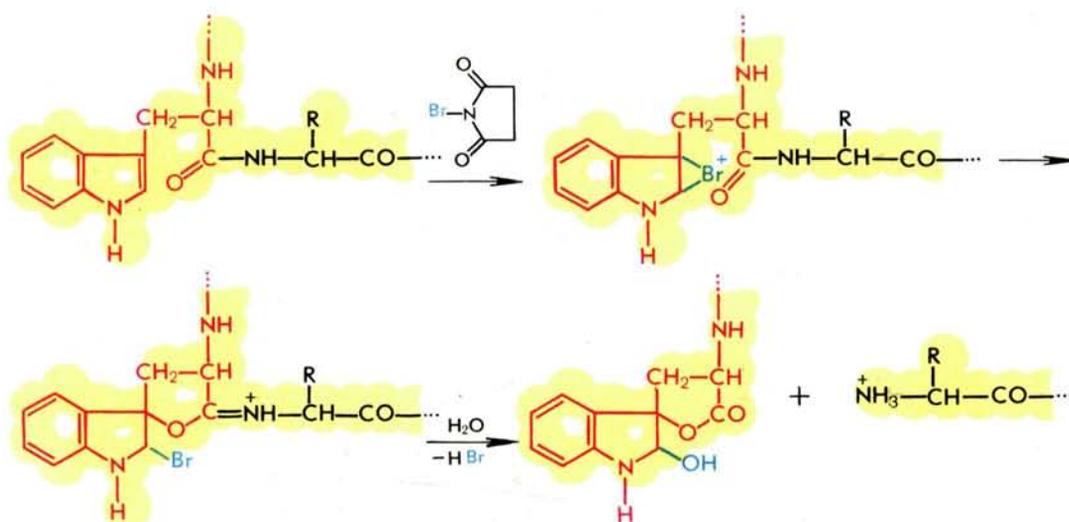
Химические методы расщепления. Среди химических методов фрагментации белков наиболее специфичным и чаще всего применяемым является расщепление бромцианом по остаткам *метионина*. Метод разработан в 1961 г. Э. Гроссом и Б. Виткопом и по избирательности действия не имеет себе равных.

Реакция с бромцианом проходит с образованием промежуточного циансульфониевого производного метионина, спонтанно превращающегося в кислых условиях в иминолактон гомосерина, который, в свою очередь, быстро гидролизуетс с разрывом иминной связи. Получающийся на С-конце пептидов лактон гомосерина далее частично гидролизуетс до гомосерина (HSer), в результате чего каждый пептидный фрагмент, за исключением С-концевого, существует в двух формах — гомосериновой и гомосеринлактоновой.

Реакцию обычно проводят при комнатной температуре в течение 15–30 ч в сильнокислой среде (чаще всего в 70%-ной муравьиной кислоте) при 100-кратном избытке бромциана на каждый остаток метионина. В этих условиях связи, образованные остатками метионина, обычно расщепляются на 90–100%. Исключение составляют связи метионина с серином и треонином, расщепляющиеся лишь частично. В условиях обработки белка бромцианом может иметь место частичный гидролиз связи Asp–Pro, неустойчивой в кислой среде.

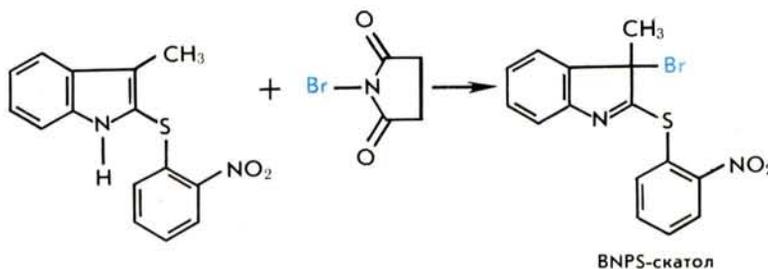


Большое число методов предложено для расщепления белка по карбонильной группе остатка *триптофана*. Одним из используемых для этой цели реагентов является N-бромсукцинимид:



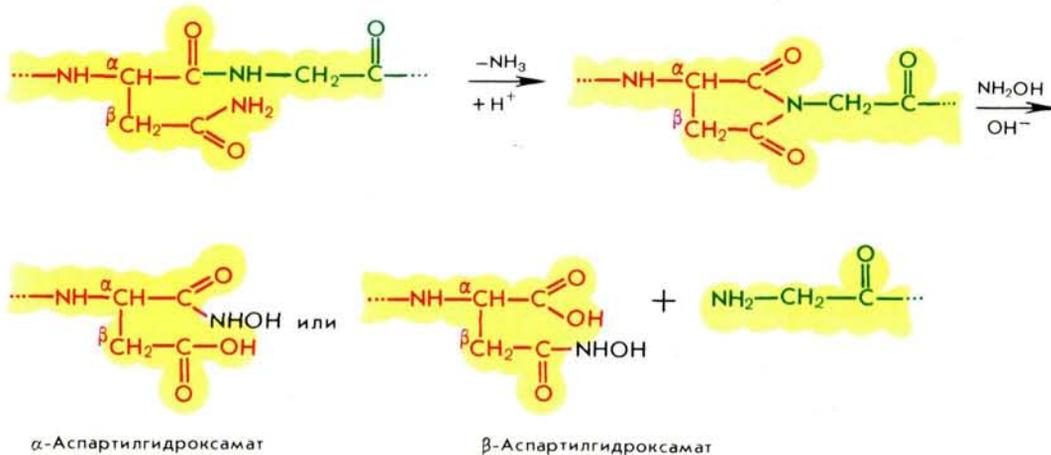
Под влиянием электрофильного агента карбонильная группа остатка триптофана способна вступать в 1,5-взаимодействие с двойной связью индольного кольца, при этом происходит окисление индола до гидроксииндолина, сопровождающееся разрывом пептидной цепи. Реакция проводится при 2 — 3-кратном избытке реагента (рН 4,0; 20 °С; 2 ч). Расщепление триптофансодержащих пептидов N-бромсукцинимидом происходит с выходом 50 — 90%, а белков — лишь 10 — 60%. N-Бромсукцинимид способен расщеплять также связи, образованные карбонильными группами остатков тирозина и гистидина, однако в более жестких условиях (увеличение избытка реагента, повышение температуры и понижение рН).

Более селективным реагентом является 2-(2-нитрофенилсульфенил)-3-метил-3-броминдол (BNPS-скатол), получаемый обработкой 2-(2-нитрофенил)сульфенилскатола N-бромсукцинимидом (А. Фонтана, 1972)



При действии на белки BNPS-скатола происходит специфическое расщепление пептидной цепи только по остаткам триптофана. Остатки метионина при этом окисляются до метионинсульфона. Оптимальные условия проведения реакции: 50%-ная уксусная кислота, 37 °С, 24 ч, 10-кратный избыток BNPS-скатола, выход составляет 30 — 70%. Реакция протекает по механизму, аналогичному механизму расщепления N-бромсукцинимидом.

В 1979 г. М. Хермодсон предложил новый метод расщепления пептидных связей, образованных остатками триптофана, с помощью о-иодозобензойной кислоты. Реагент селективно разрывает связи Тгр — X, не модифицируя остатки тирозина и гистидина; метионин может окисляться до сульфоксида. Остатки цистеина и цистина необходимо предварительно защищать путем S-алки-

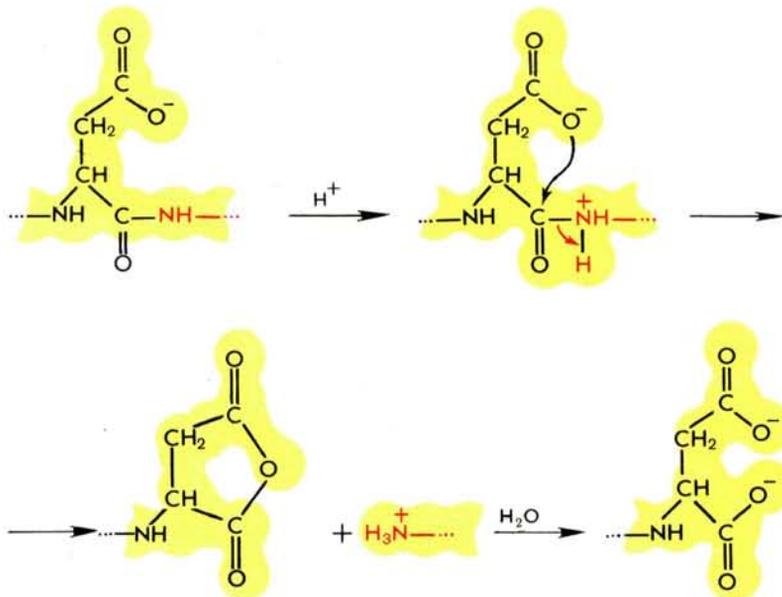


лирования. Реакция проводится в 80%-ной уксусной кислоте в присутствии 2-кратного избытка *о*-иодозобензойной кислоты в течение 24 ч при 20 °С, выход достигает 70 — 100%.

В структурных исследованиях нашел применение метод расщепления полипептидной цепи гидроксиламином по связи *аспарагинил-глицил*. Как показали исследования механизма реакции, с гидроксиламином взаимодействует циклический имид ангидрида аспартил-глицила, образующийся из аспарагинил-глицила. Этому превращению способствует предварительное выдерживание белка в кислой среде.

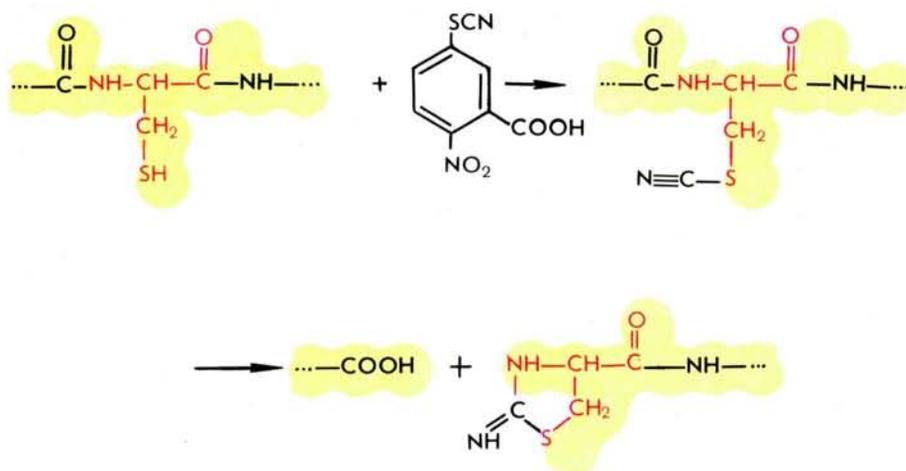
При реакции ангидроаспартил-глицила с гидроксиламином в щелочной среде (рН 10,5) и при температуре 35—60 °С происходит расщепление пептидной цепи с образованием смеси α - и β -аспартилгидроксаматов. У большинства изученных белков при действии гидроксиламина в указанных условиях проходило специфичное расщепление связей Asp—Gly на 50 — 70%. Незначительный разрыв других пептидных связей, например Asp—Leu, наблюдался редко.

В ряде случаев для расщепления белковых молекул используется метод частичного кислотного гидролиза. Наиболее чувствительными к действию кислот являются аспартильные пептидные связи. Механизм реакции гидролиза, вероятно, включает в себя замещение карбоксильным анионом протонированного атома азота пептидной связи:



Наименее устойчивы в кислых условиях связи Asp—Pro. Повышенная их лабильность обусловлена тем, что атом азота остатка пролина в пептидных связях имеет наибольшую основность по сравнению с остатками других аминокислот и легче протонируется. Подобраны условия (10%-ная уксусная кислота — пиридин, рН 2,5, 7 М гуанидин · HCl, 40 °С, 4 суток), при которых связи Asp—Pro расщепляются достаточно селективно и с большим выходом (до 90%).

В 1974 г. А. Патчорник предложил метод расщепления пептидных связей, образованных остатком цистеина, с помощью 2-нитро-5-тиоцианатобензойной кислоты (НТЦБ):



НТЦБ цианирует остаток цистеина, превращая его в остаток β -тиоцианатоаланина, который в мягких условиях (рН 8,0 — 9,0; 37 °С; 12 — 16 ч) циклизуется в 2-иминотиазолидинкарбоновую кислоту с разрывом пептидной связи. Расщепление полипептидной цепи по остаткам цистеина в указанных условиях специфично и обычно проходит с выходом 80 — 90%.

Существенным недостатком метода является то, что полученные при расщеплении фрагменты, за исключением N-концевого, не содержат свободной α -аминогруппы и поэтому не могут подвергаться деградации по методу Эдмана. С помощью восстановительного десульфирования на никелевом катализаторе удастся превращать иминотиазолидинкарбоновую кислоту в аланин. Однако при этом наблюдается частичное расщепление некоторых пептидных связей.

Среди описанных методов химического расщепления наибольшее применение при исследовании первичной структуры белков находит деградация бромцианом по остаткам метионина. Относительно широко используется расщепление по остаткам триптофана и по связи Asn—Gly. Значительно реже применяют частичный кислотный гидролиз по связи Asp—Pro и расщепление по остаткам цистеина и тирозина. При расщеплении белков по остаткам метионина, триптофана и цистеина обычно образуются крупные пептидные фрагменты, содержащие в среднем 40 — 80 аминокислотных остатков, что связано с низким содержанием этих аминокислот в белках. Более крупные пептиды могут быть получены при расщеплении связей Asn—Gly и Asp—Pro.

Разделение смеси пептидных фрагментов, образовавшихся при расщеплении полипептидной цепи белка ферментативными или химическими методами, является одним из наиболее сложных и ответственных этапов в процессе определения первичной структуры. Успех на этом этапе во многом зависит от опыта, знаний, изобретательности исследователя и его искусства.

При выборе методов разделения пептидов необходимо учитывать количества разделяемых веществ и их физико-химические свойства. Одним из основных параметров является длина полипептидной цепи. Методы разделения сравнительно коротких пептидов, содержащих до 15 — 20 аминокислотных остатков, хорошо разработаны.

Для первичного фракционирования смесей, содержащих несколько десятков пептидов, часто используют ионообменную хроматографию на катионитах типа дауэкс, представляющих собой сульфированный сополимер полистирола и дивинилбензола (рис. 9). Элюирование пептидов с колонки проводится с помощью специально подобранных градиента pH и концентрации летучего пиридин-ацетатного буфера. Детекция пептидного материала в элюате осуществляется путем измерения оптического поглощения при 254 нм в пробе после реакции с нингидрином. Иногда вместо нингидрина используется о-фталевый альдегид и какие-либо специфичные реакции (например, реакция Сакагучи, позволяющая обнаруживать аргининсодержащие пептиды). Состав объединенных фракций после ионообменной хроматографии исследуется с помощью аналитической хроматографии в тонком слое целлюлозы и анализа концевых аминокислотных остатков. Результаты аналитических опытов служат основой для выбора последующей схемы деления и очистки пептидов. Для этой цели обычно применяются хроматография и электрофорез на бумаге или пластинках с тонким слоем целлюлозы или силикагеля.

При разделении менее сложных смесей (10 — 15 пептидов) часто опускается стадия ионообменной хроматографии. Выбор схемы разделения проводится на основании анализа так называемых «пептидных карт». Для получения пептидной карты (рис. 10) смесь пептидов, образовавшаяся в результате ферментативного или химического гидролиза белка, наносится в виде небольшой полоски на лист хроматографической бумаги или пластинки с тонким слоем целлюлозы и подвергается электрофорезу или хроматографии во взаимно перпендикулярных направлениях. После проявления пептидной карты специфичным реактивом на бумаге или пластинке образуется характерный для данного белка набор пятен, их взаимное расположение позволяет оценить эффективность использованных методов разделения и выбрать оптимальный вариант.

С помощью метода пептидных карт можно проводить препаративное разделение смеси небольшого числа пептидов. Для этого при проявлении пептидной карты используются низкие концентрации соответствующих реактивов (нингидрина или

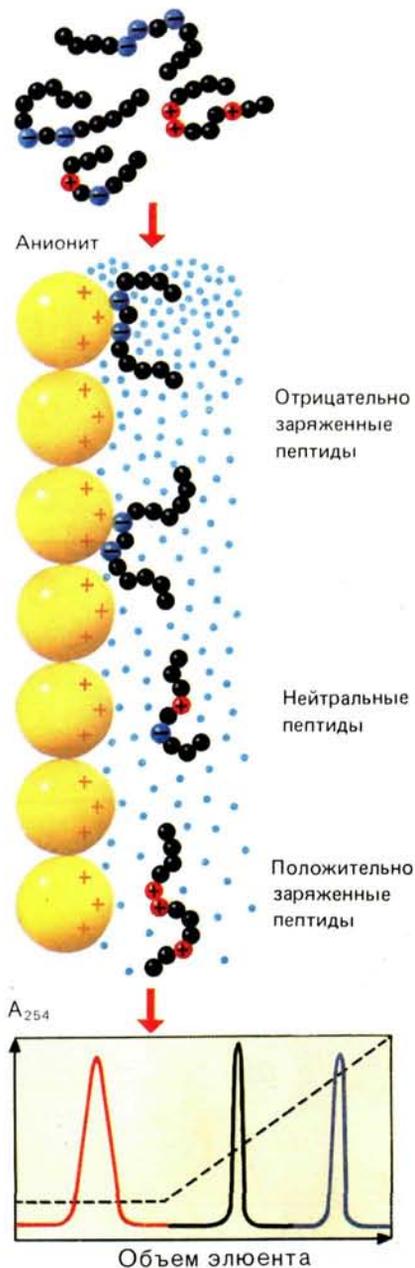
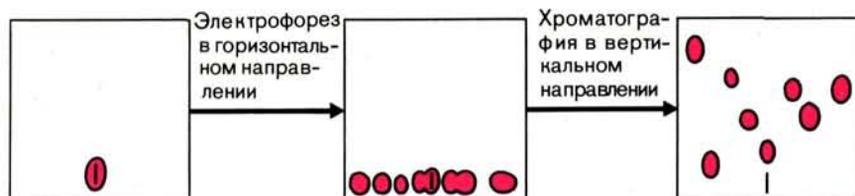


Рис. 9. Разделение пептидов методом ионообменной хроматографии.

Рис. 10. Разделение пептидов методом пептидных карт.



флуорескамина), в результате чего значительная часть пептидов не реагирует с реактивом и может быть элюирована с носителя для структурных исследований. Пептидные карты удобно применять также для выделения радиоактивно или флуоресцентно меченных пептидов.

Значительно более трудную задачу представляет разделение смесей крупных пептидов, содержащих более 20 аминокислотных остатков. Основная сложность связана со свойством таких пептидов «слипаться» в водных растворах друг с другом и образовывать высокомолекулярные агрегаты. С целью предотвращения агрегации в буферные растворы добавляются детергенты (мочевина, гуанидин-гидрохлорид, додецилсульфат натрия).

Для разделения смеси крупных пептидов обычно применяется метод гель-фильтрации, позволяющий проводить фракционирование по молекулярной массе. В качестве неподвижной фазы используются высокогидрофильные декстраны с поперечными «сшивками» (сефадексы) или полиакриламидные гели (биогели) (рис. 11). Они хорошо набухают в воде, образуя гели, которые действуют подобно молекулярному сити. В настоящее время выпускается более 20 типов сефадексов и более 30 типов биогелей, различающихся частотой поперечных сшивок и размером гранул. Выбор носителя для хроматографической колонки определяется молекулярной массой разделяемых пептидов.

Широко используемым методом разделения крупных пептидов является также ионообменная хроматография, в качестве носителей в этих случаях служат ионообменные целлюлозы: диэтил-аминоэтил-(DEAE)- и карбоксиметил-(CM)- и ионообменные полимеры декстрана: DEAE-, CM-, сульфоэтил-(SE)-, сулфопропил (SP)- и диэтил-2-гидроксипропил-аминоэтил- (QAE-) сефадексы.

Гидрофильные свойства таких ионообменников, их способность набухать в водной среде обеспечивают лучшие условия проницаемости для крупных молекул по сравнению со смолами на основе полистирола. Хроматография проводится обычно в водных трис-HCl [(гидрокси)метил]аминометан-гидрохлорид, $\text{H}_2\text{NC}(\text{CH}_2\text{OH})_3 \cdot \text{HCl}$] буферах, содержащих 6–8М раствор мочевины. Элюирование пептидов осуществляется при постепенном повышении ионной силы раствора.

Для фракционирования крупных пептидов иногда применяется метод противоточного распределения, в котором разделение основано на различной растворимости веществ в несмешивающихся жидкостях, например фенол — вода или бутанол — вода. Один из вариантов этого метода заключается в простой экстракции пептидов *n*-бутанолом из водного раствора.

В последние годы для разделения смесей пептидов очень широко применяется высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) на носителях с обращенной фазой (рис. 12), которые представляют собой силикагель с ковалентно присоединенными углеводородами, содержащими обычно 8 или 18 углеродных атомов. Используется также и просто хроматография на силикагеле. Разделение проводится с помощью специального жидкостного хроматографа, в комплект которого входят: колонки, особым образом упакованные, насос, позволяющий создавать давление до 200 атм, градиентный смеситель, работающий с высокой степенью воспроизводимости, и высокочувствительный ультрафиолетовый или флуоресцентный детектор (рис. 13). К достоинствам метода следует отнести исключительно высокую скорость разделения (менее 1 ч), воспроизводимость результатов и возможность проводить аналитические опыты на микрограммовых количествах вещества. Особенно эффективно применение ВЭЖХ для разделения смесей низкомолекулярных пептидов, образующихся при ферментативном расщеплении белков. Хроматография обычно проводится на колонках с обращенной фазой C_{18} в 0,05%-ной трифторуксусной кислоте с исполь-

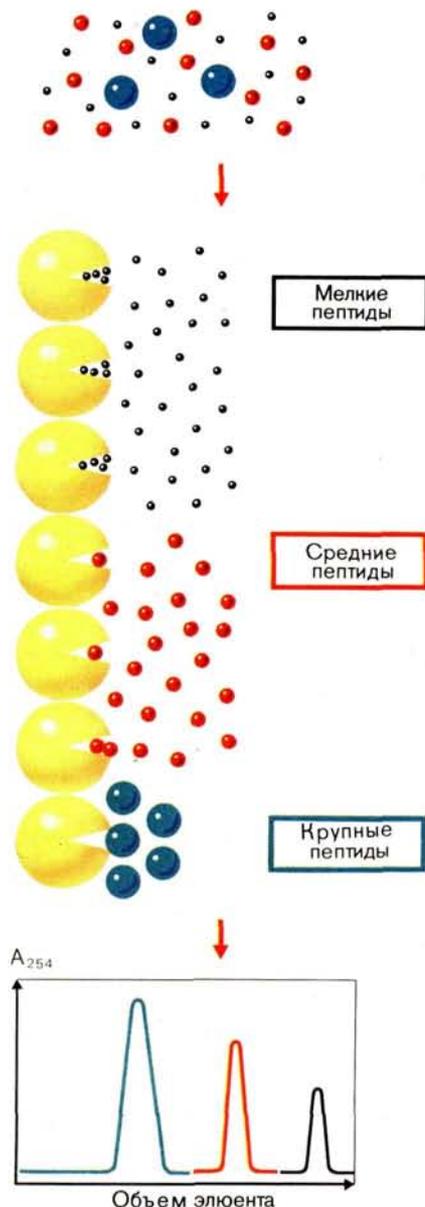


Рис. 11. Разделение пептидов методом гель-фильтрации.

зованием для элюирования градиента ацетонитрила. Разрешающая способность таких носителей превосходит разрешающую способность ионообменных смол. С помощью ВЭЖХ в ряде случаев удается разделить смеси высокомолекулярных пептидов и белков.

Аналитический контроль за процессом разделения высокомолекулярных пептидов осуществляется с помощью электрофореза в полиакриламидном геле. Электрофорез проводится в присутствии додецилсульфата натрия, который образует мицеллы с разделяемым веществом, нивелируя его электрический заряд, в результате чего разделение происходит исключительно по молекулярной массе. Метод имеет большую чувствительность и высокую разрешающую способность. Электрофорез используют и для непосредственного разделения небольших количеств пептидов.

Часто перед исследователями встает задача селективного выделения из суммарного гидролизата белка пептидов, несущих определенные функциональные группы. Для этих целей может быть эффективно использована хемоспецифическая, или ковалентная, хроматография, основанная на образовании ковалентной связи пептида с носителем. Чаще всего метод ковалентной хроматографии применяют для селективного выделения цистеинсодержащих пептидов. В основу метода положена иммобилизация пептидов, содержащих свободные сульфгидрильные группы, на носителях с активированными SH-группами за счет реакции тиол-дисульфидного обмена, в результате которой между пептидом и носителем образуется дисульфидная связь (рис. 14). При этом дисульфиды, не содержащие остатков цистеина, не связываются с носителем и удаляются при промывании соответствующим буфером. Цистеинсодержащие пептиды выделяют далее восстановлением дисульфидных связей при pH 8,0 избытком меркаптоэтанола или дитиотреита. Более селективного разделения тиолсодержащих и тиолнесодержащих пептидов можно достигнуть, если проводить ферментативный или химический гидролиз белка, предварительно иммобилизованного на нерастворимом носителе. В качестве носителя в обоих случаях используется тиол-сефароза 4В, которая содержит в качестве активированной группы смешанный дисульфид, образующийся при обработке глутатион-сефарозы 2,2'-дипиридилдисульфидом.

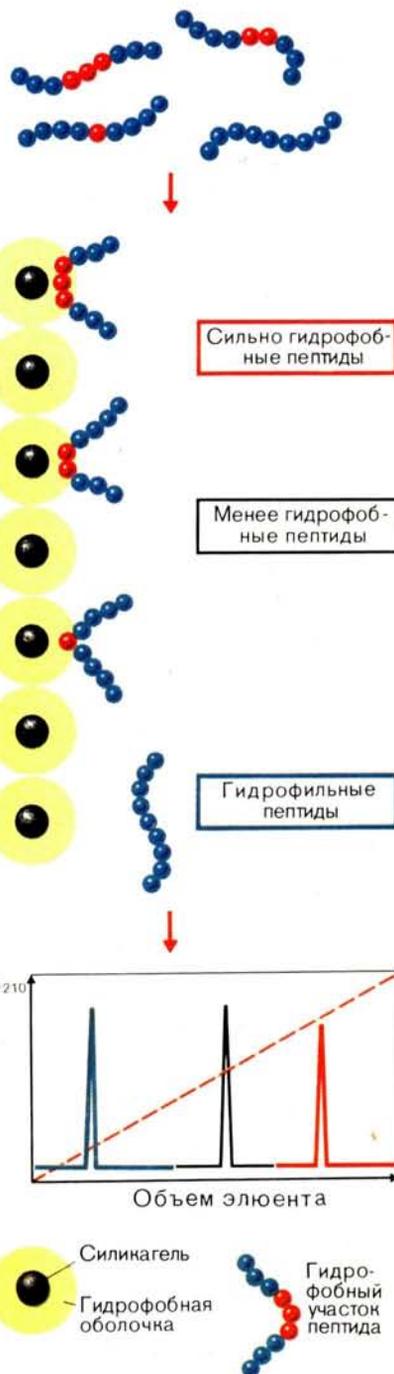
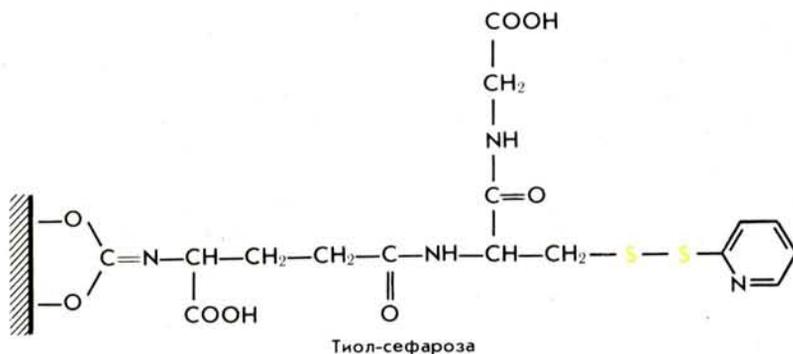
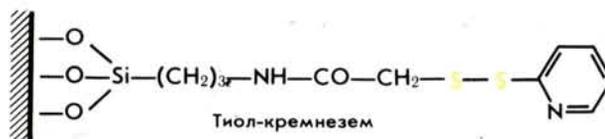


Рис. 12. Разделение пептидов хроматографией на обращенной фазе.

Значительно большей химической устойчивостью обладают матрицы на неорганической основе — пористое стекло, кремнезем. Так, на активированном тиол-кремнеземе можно проводить иммобилиза-



цию труднорастворимых (мембранных) белков и осуществлять последующий химический гидролиз конъюгата.

Рис. 13. Жидкостной микроколоночный хроматограф «Миллихром» (СССР, ПО «Научприбор», г. Орел).

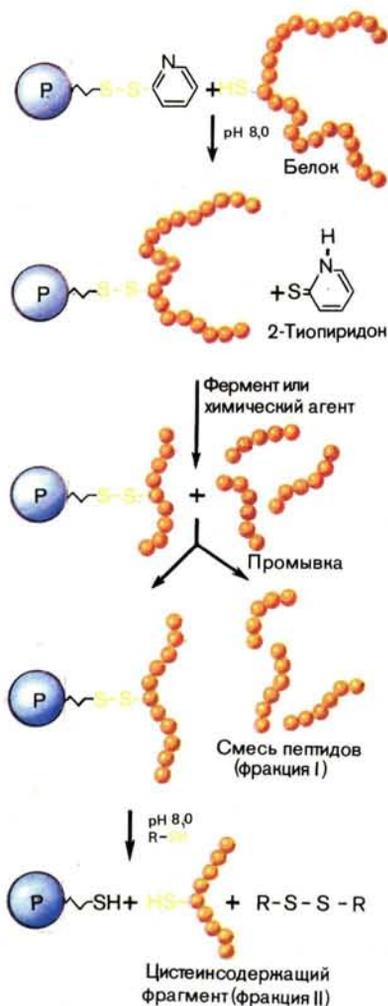
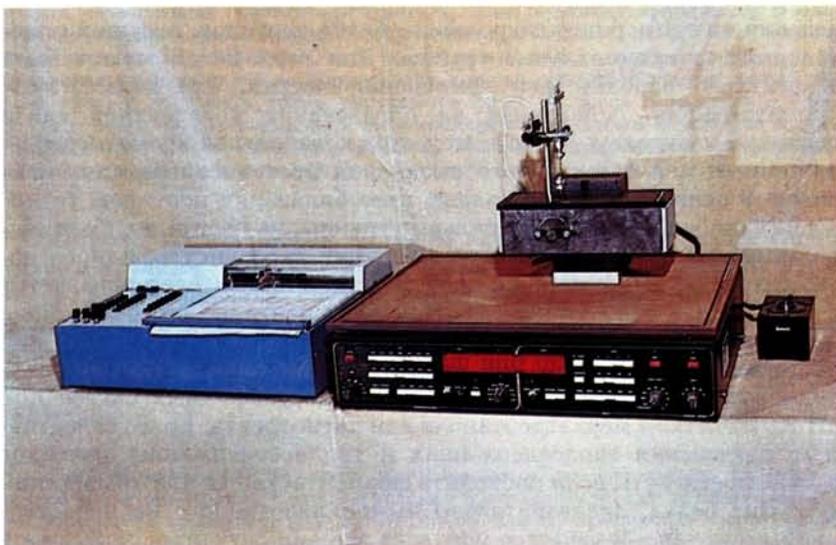


Рис. 14. Разделение тиолсодержащих и тиолнесодержащих пептидов ковалентной хроматографией.

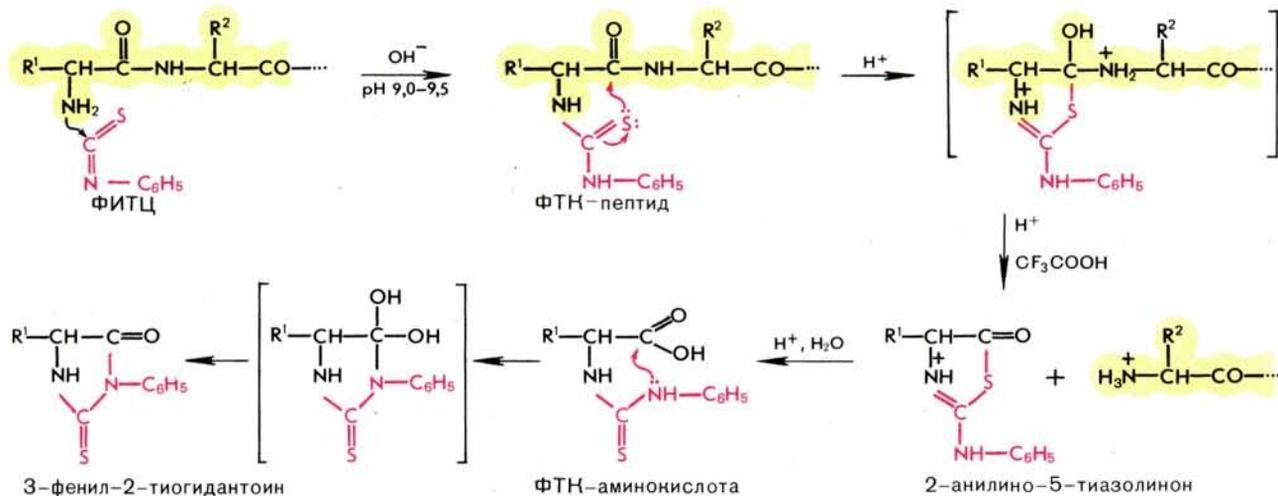
Существуют также методы ковалентного присоединения к носителям триптофан- и лизинсодержащих пептидов, однако они применяются относительно редко.

Для селективного выделения пептидов можно использовать иммуносорбенты, представляющие собой антитела, ковалентно присоединенные к нерастворимому полимеру-носителю. Среди последних нашли распространение носители на основе производных бром-ацетилцеллюлозы и гелей агарозы с ковалентно присоединенными антителами к 2,4-динитрофенолу. Такие носители применяются для выделения функционально важных пептидных фрагментов, содержащих реакционноспособные аминокислотные остатки после их селективного динитрофенилирования. Разработаны методики присоединения 2,4-динитрофенильной группы к остаткам цистеина, метионина, лизина и триптофана.

Новые возможности для специфичного выделения отдельных фрагментов белка открылись в связи с разработкой техники моноклональных антител (рис. 15). Иммуносорбенты на основе моноклональных антител к различным участкам белковой молекулы могут быть использованы для селективного выделения пептидных фрагментов, несущих антигенные детерминанты этих антител. Поскольку в основном антигенные детерминанты находятся во фрагментах полипептидной цепи, располагающихся на поверхности глобулы, метод применяется также для изучения топографии белков.

Для установления аминокислотной последовательности белков используется совокупность химических, ферментативных и физико-химических методов. Ниже будут рассмотрены те из них, которые нашли наиболее широкое применение в практике структурной химии белка.

Метод Эдмана. Основным методом определения аминокислотной последовательности является метод деградации полипептидной цепи с помощью фенолизоцианата (ФИТЦ), разработанный П. Эдманом в 1950 — 1956 гг. Метод Эдмана позволяет последовательно отщеплять N-концевые аминокислотные остатки в виде фенолтиогидантоинов (ФТГ). Каждый цикл деградации включает три стадии: 1) образование фенолтиокарбамоил (ФТК)-пептида, 2) отщепление N-концевого остатка аминокислоты в форме анилинотиазолинона, 3) изомеризацию тиазолинона в ФТГ и идентификацию последнего.



На первой стадии происходит присоединение ФИТЦ к непротонированной α -аминогруппе пептида.

Реакция проводится в летучих буферных системах (pH 9,0 — 9,5); в качестве оснований используются третичные или гетероциклические амины (триэтиламин, диметилаллиламин, пиридин). Выход на этой стадии может существенно снижаться вследствие побочных реакций. Такими реакциями являются окислительное десульфирование ФТК-группы пептида под действием кислорода воздуха, блокирование α -аминогруппы пептида за счет образования оснований Шиффа со следовыми количествами альдегидов, присутствующих в реагентах и растворителях. Поэтому все стадии деградации пептида по методу Эдмана проводятся в атмосфере инертного газа, а употребляемые реагенты предварительно тщательно очищаются. В щелочных условиях ФИТЦ гидролизуется с образованием дифенилтиомочевины и анилина. Побочные продукты затрудняют идентификацию фенолтиогидантоинов аминокислот, поэтому после стадии присоединения производится экстракция реакционной смеси бензолом для удаления остатков ФИТЦ и побочных продуктов.

На второй стадии деградации в присутствии безводной сильной кислоты (обычно трифторуксусной) происходит отщепление N-концевой аминокислоты с образованием 2-анилино-5-тиазолинона и освобождение α -аминогруппы последующего аминокислотного остатка.

Условия реакции достаточно мягкие и обычно не вызывают неспецифического расщепления полипептидной цепи. Однако остатки глутамина, когда они становятся N-концевыми в пептиде, могут превращаться в остатки пироглутаминовой кислоты, блокирующие дальнейшую деградацию.

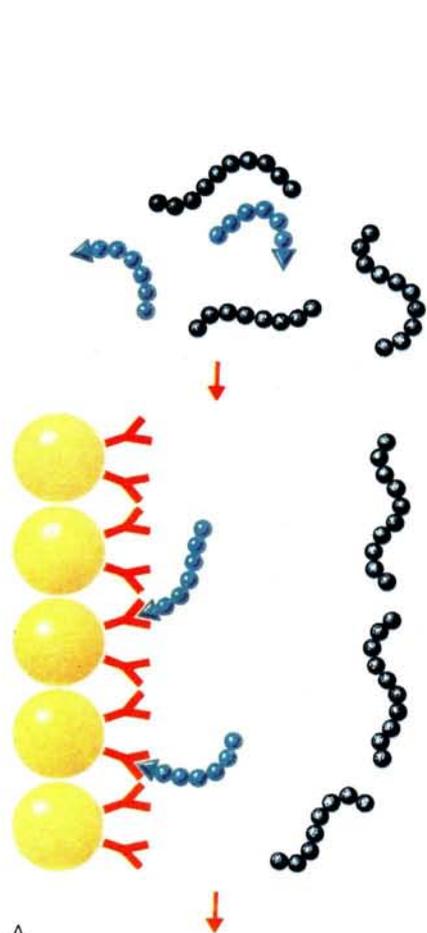
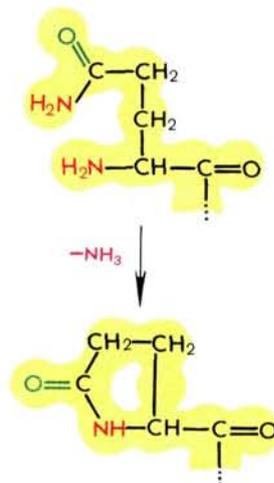


Рис. 15. Разделение пептидов аффинной хроматографией на иммуносорбенте.



Аспарагин в кислых условиях (особенно в случае последовательности Asn — Gly) может образовывать циклический имид (см. с. 51), также препятствующий процессу.

Стадия изомеризации состоит из двух последовательных реакций — быстрый гидролиз тиазолинона в ФТГ-производное аминокислоты и циклизация последнего в 3-фенил-2-тиогидантоин.

Некоторые ФТГ частично разрушаются в условиях изомеризации (1 н. HCl, 80 °С, 10 мин). Так, ФТГ серина легко отщепляет молекулу воды, в меньшей степени процесс деградации протекает и у треонина. Для предотвращения разрушения ФТГ изомеризация иногда проводится в присутствии различных тиолов (дитиозеритритол, бутандиол и др.).

Идентификация отщепленных ФТГ является определяющей стадией в процессе деградации пептидов по методу Эдмана. В течение длительного времени для этой цели использовалась хроматография на бумаге, однако затем она была вытеснена другими более чувствительными и скоростными методами: микротонкослойной хроматографией на силикагеле и полиамиде, жидкостной и газожидкостной хроматографией.

Для одномерной и двумерной микротонкослойной хроматографии разработан ряд систем растворителей. Способ обнаружения ФТГ основан на сильном поглощении этих производных в УФ-области спектра ($\lambda_{\text{макс.}} = 265 - 270$ нм, среднее значение молярного коэффициента экстинкции равно 16 000). В состав сорбента на пластинках добавляется флуоресцентный индикатор. Чувствительность метода составляет 1 нмоль вещества.

Жидкостная и газожидкостная хроматография для идентификации ФТГ обычно используется в комбинации с автоматической деградацией пептидов на секвенаторе (см. ниже). При газожидкостной хроматографии ФТГ после перевода в летучее состояние разделяются на специальных колонках, наполненных жидкой фазой (обычно смесь силиконовых фаз). Некоторые ФТГ перед хроматографированием необходимо силилировать, чтобы повысить их летучесть (Asp, Glu, CMCys, CysSO₃H) или улучшить разделение (Ser, Thr, Lys). Поэтому анализ обычно проводится в два приема (до и после силилирования).

В последние годы наиболее широкое применение для идентификации ФТГ находит жидкостная хроматография высокого разрешения на колонках с обращенной фазой. Хроматография проводится

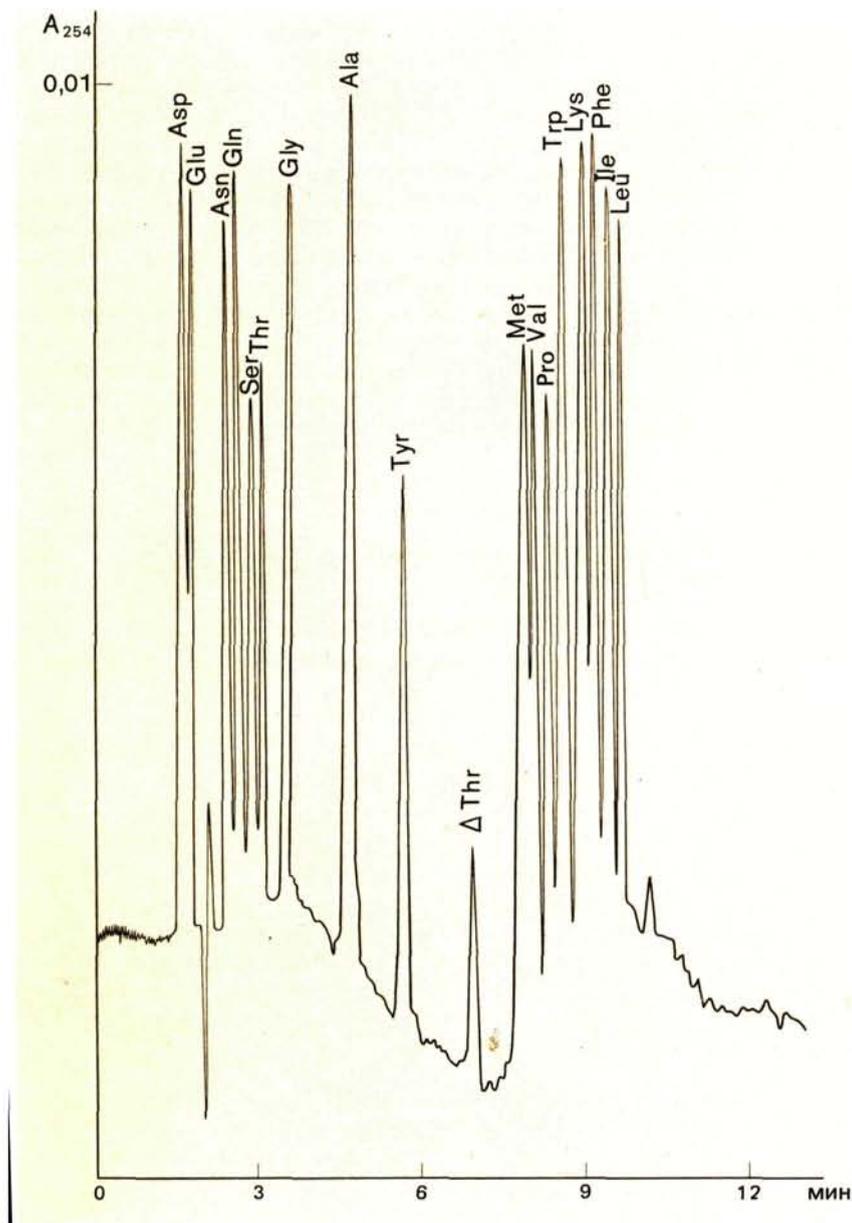


Рис. 16. Разделение ФТГ-аминокислот (50 пмоль) методом ВЭЖХ на колонке с обращенной фазой («Ультрасфер ODS») в градиенте ацетонитрил → трифторацетат натрия.



Эдман (Edman) Пэр Виктор (1916—1977), шведский химик. Окончил Каролинский институт в Стокгольме (1946); с 1957 г.— руководитель отдела молекулярной биологии в Институте медицинских исследований в Мельбурне (Австралия) и с 1971 г.— в Институте биохимии Общества М. Планка в Мартинсриде (ФРГ). Автор широко известного метода определения первичной структуры пептидов и белков. Совместно с Дж. Бэгом разработал конструкцию прибора для автоматического определения аминокислотной последовательности.

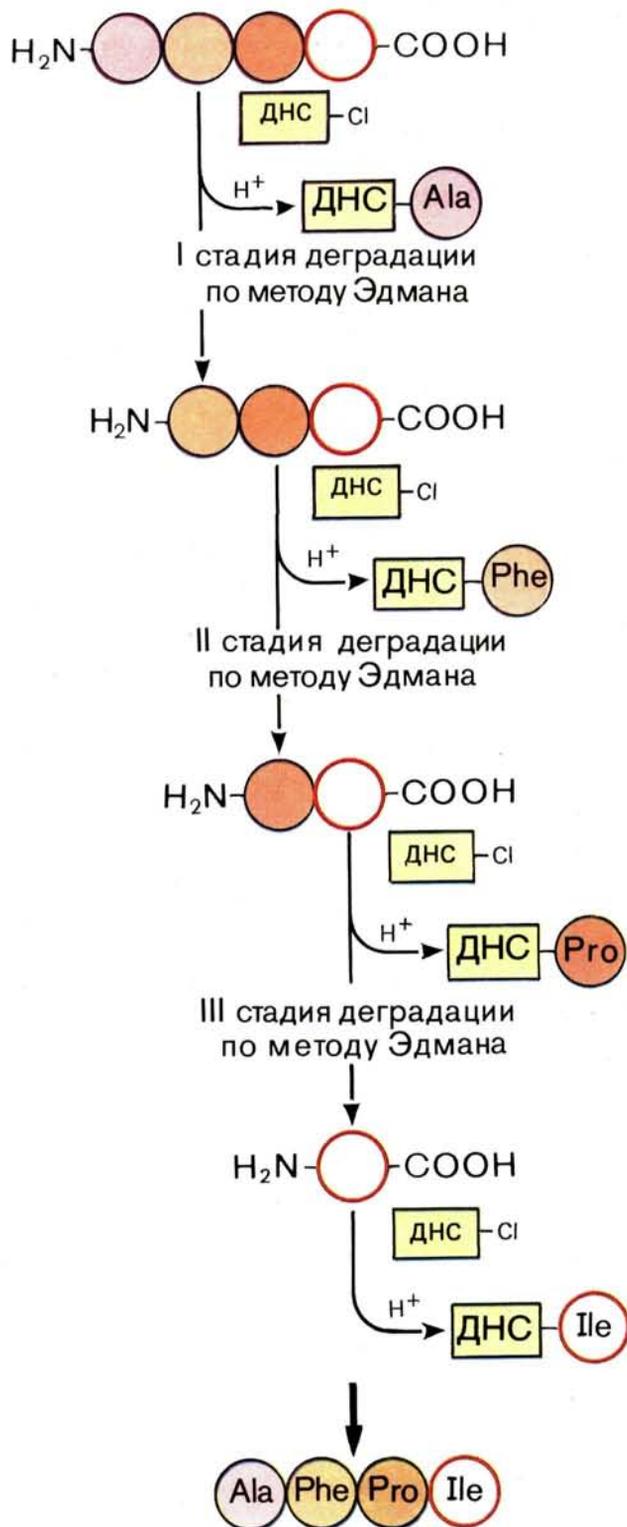


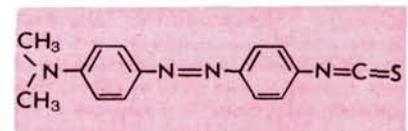
Рис. 17. Определение аминокислотной последовательности пептида методом ДНС-Эдмана.

либо в градиенте концентрации ацетонитрила или метанола (рис. 16), либо в изократных условиях (в отсутствие градиента). Достоинствами метода являются: высокая чувствительность (30 — 50 пмоль), скорость (на один анализ требуется менее 10 мин), хорошая разрешающая способность и возможность количественного определения ФТГ. Часто для идентификации аминокислот, отщепляемых при деградации пептидов по методу Эдмана, используются также масс-спектрометрия и аминокислотный анализ. В последнем случае анализируемый ФТГ вначале гидролизуют с помощью HI до свободной аминокислоты.

Среди модификаций метода Эдмана широкое применение нашел метод, сочетающий последовательную деградацию пептида с анализом N-концевых аминокислотных остатков в виде их дансильных производных (ДНС-Эдман). По этому методу перед каждым циклом деградации отбирается определенная аликвотная часть пептида для анализа N-концевой аминокислоты (рис. 17). Достоинства метода — более высокая чувствительность определения ДНС-аминокислот и меньшие потери материала на каждой стадии деградации за счет исключения экстракции бензолом ФТК-производных пептидов. Ограниченная доступность биологического материала вызывает необходимость работы с субмикрочислотами белков и побуждает к поиску новых методов структурного анализа. Существует большое число аналогов ФИТЦ, которые образуют тиогидантоины, обладающие рядом преимуществ по сравнению с ФТГ. Наибольшее распространение в практике лабораторных исследований получил 4-N,N-диметиламиноазобензол-4'-изотиоцианат (ДАБИТЦ).

Образующиеся при деградации пептида с ДАБИТЦ ярко-розовые 4-N,N-диметиламиноазобензол-4'-тиогидантоины (ДАБТГ) имеют коэффициент экстинкции ($\epsilon_{436} = 34\ 000$) примерно в два раза более высокий, чем у ФТГ. Чувствительность идентификации ДАБТГ при тонкослойной хроматографии на полиамиде составляет 0,01 — 0,05 нмоль (рис. 18).

Чтобы избежать необходимости использования высоких температур (75 °С) для количественного связывания ДАБИТЦ с N-концевой аминогруппой, применяется двойное карбамоилирование (сначала с ДАБИТЦ, а затем с ФИТЦ) при обычной температуре (45 °С). Метод дает хорошие результаты особенно при анализе труднорастворимых гидрофобных пептидов. К его недостаткам следует отнести затруднения с идентификацией неустойчивых ДАБТГ серина, треонина и лизина.



ДАБИТЦ

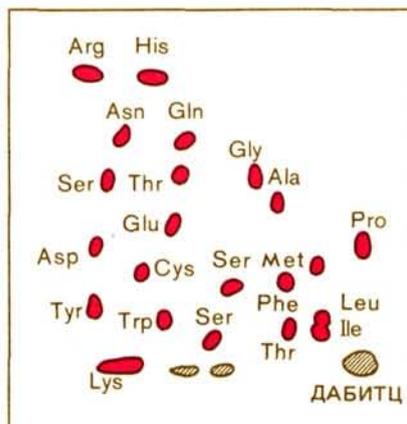
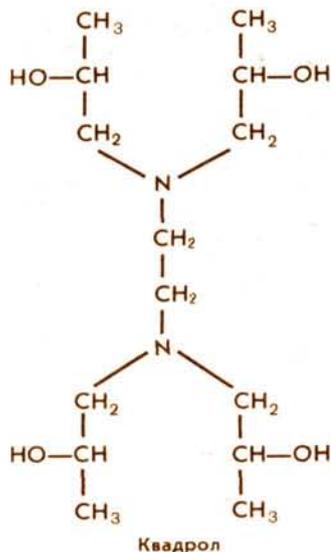


Рис. 18. Разделение ДАБТГ-аминокислот двумерной тонкослойной хроматографией на полиамиде.



Автоматическое определение аминокислотной последовательности. Крупным достижением в области структурных исследований белков явилось создание в 1967 г. П. Эдманом и Дж. Бэггом секвенатора — прибора, который с высокой эффективностью осуществляет последовательное автоматическое отщепление N-концевых аминокислотных остатков по методу Эдмана. В секвенаторе все реакции проводятся в цилиндрическом стеклянном стаканчике (рис. 19), вращающемся с постоянной скоростью в атмосфере инертного газа. Исследуемый образец белка наносится в виде тонкой пленки на стенки стаканчика, а реактивы и растворители по шлангу подаются на его дно. За счет центробежной силы они поднимаются по стенкам, соприкасаются с пленкой белка, затем собираются в специальной канавке в верхней части стаканчика и удаляются по отводному шлангу. Большая поверхность соприкосновения между двумя фазами способствует легкому проникновению реагентов сквозь пленку белка, быстрому протеканию реакций и беспрепятственной экстракции продуктов реакции.

В секвенаторе исключен контакт анализируемого образца белка с кислородом воздуха и стандартизованы условия проведения всех стадий реакции. Наряду с тщательной очисткой используемых реагентов и растворителей, это позволяет проводить автоматическое отщепление аминокислотных остатков с выходом 95% и выше. Для предотвращения испарения реагентов в большой объем реакционного стаканчика в качестве основания в реакции присоединения применяют квадрол — (N,N,N',N'-тетра(2-гидроксипропил)-этилендиамин, а в реакции отщепления — гептафтормасляную кислоту, обладающие пониженной летучестью. В секвенаторе проводятся только первые две стадии реакции Эдмана — присоединение и отщепление. Образовавшиеся в результате анилинотиазолиноны экстрагируются и собираются в коллекторе фракций. Их превращение в ФТГ осуществляется вручную или с помощью автоматической приставки — конвертера.

Наилучшими объектами для жидкофазного секвенатора являются белки и пептиды, содержащие в своем составе от 60 до 200 аминокислотных остатков. Для них обычно удается определять последовательность 30 — 50 остатков. При исследовании более крупных белков в процессе деградации наблюдается значительный гидролиз

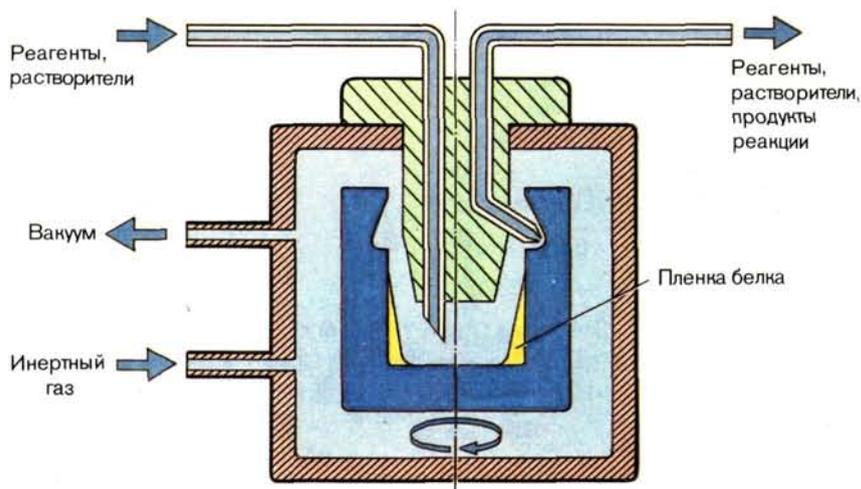
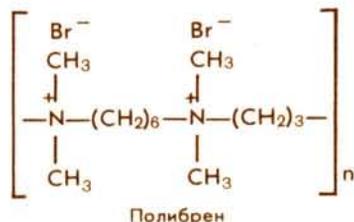
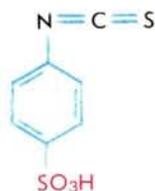


Рис. 19. Схема реакционной камеры жидкостного секвенатора.

лабильных пептидных связей внутри полипептидных цепей. С другой стороны, короткие пептиды, особенно пептиды, содержащие в своем составе гидрофобные аминокислотные остатки, интенсивно вымываются из стаканчика секвенатора. Для предотвращения такого рода потерь пептидов разработан ряд методических приемов. Один из них предусматривает добавление в реакционную камеру специальных носителей, препятствующих механическому удалению пептида. В качестве носителей используются белки, не содержащие свободной α -аминогруппы (например, цитохром *c*), или синтетические полимеры: полиорнитин и полибрен.



Растворимость пептида в органических растворителях резко уменьшается при увеличении его гидрофильности. Для повышения гидрофильности можно использовать так называемые реагенты Брауницера, являющиеся высокополярными аналогами фенилизотиоцианата.



Реагент Брауницера I



Реагент Брауницера III



Брауницер [Braunitzer] Герард (р. 1921), немецкий химик-биоорганик. Окончил Технический университет в Граце (1947), с 1972 г. — директор Института биохимии Общества М. Планка в Мартинсриде (ФРГ). Установил первичную структуру белка вируса табачной мозаики (1956) и большого числа гемоглобинов.



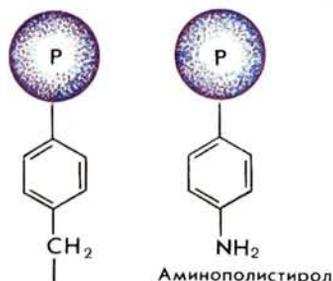
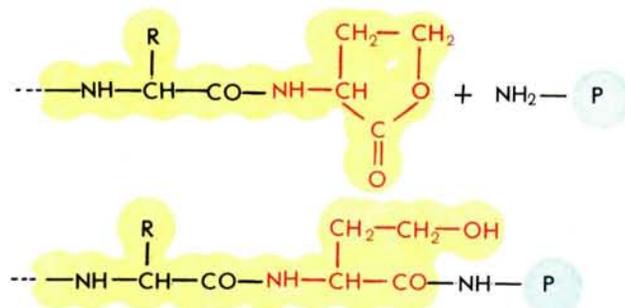
Ларсен [Laursen] Ричард Аллан (р. 1938), американский химик и биохимик. Получил образование в Калифорнийском университете в Беркли (1961) и Иллинойском университете в Урбана (1964), работал в Бостонском университете (1966). Впервые предложил метод твердофазной деградации пептидов.

Если на первой стадии деградации по методу Эдмана вместо ФИТЦ добавить реагент Брауницера, то за счет модификации ϵ -аминогрупп значительно повысится гидрофильность лизинсодержащих пептидов, в результате чего они могут успешно анализироваться с помощью секвенатора.

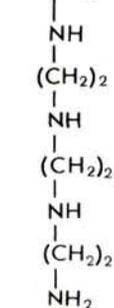
Другой вариант автоматического определения аминокислотной последовательности коротких пептидов, основанный на ковалентном присоединении их к нерастворимому носителю, предложен Р. Ларсеном. Реакционным сосудом в твердофазном секвенаторе служит хроматографическая колонка, с носителем которой ковалентно связан исследуемый пептид. Через колонку последовательно пропускаются необходимые реагенты и растворители. Присоединение пептида к носителю является определяющей стадией в процессе. Для этой цели широко применяются матрицы на основе

полистирола и пористого стекла. В качестве функциональной группы, реагирующей с пептидом, обычно используется алифатическая (ароматическая) аминогруппа, связанная с носителем «ножкой» различной длины.

Легко могут быть иммобилизованы бромциановые пептиды, содержащие в качестве С-концевого остатка реакционноспособный лактон гомосерина; для полного превращения остатка гомосерина в лактон они предварительно обрабатываются трифторуксусной кислотой.

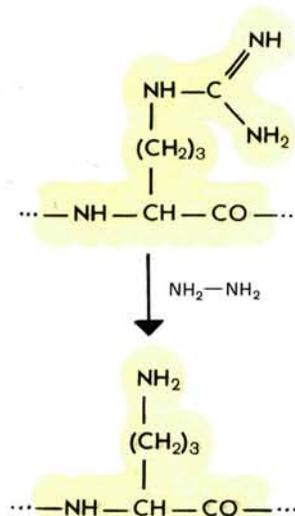
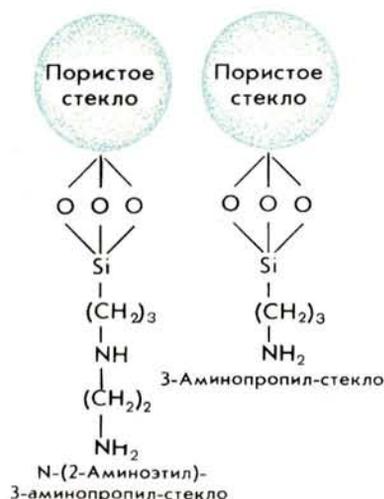


Триэтилен-тетрааминопполистирол



Конденсация лактона гомосерина с аминогруппами носителя обычно проходит с выходом 60 — 100% и не сопровождается побочными реакциями. Аналогичным образом для ковалентного присоединения пептидов используется лактон, образующийся при расщеплении пептидных связей по остаткам триптофана с помощью N-бромсукцинимиды или BNPS-скатола (см. с. 50).

Лизинсодержащие пептиды присоединяются к носителю по ε-аминогруппам путем конденсации с п-фенилендиизотиоцианатом. При этом связанной с носителем оказывается также и α-аминогруппа N-концевого остатка пептида. Однако после первого цикла деградации освобождается α-аминогруппа второго аминокислотного остатка, и процесс может быть продолжен обычным образом.

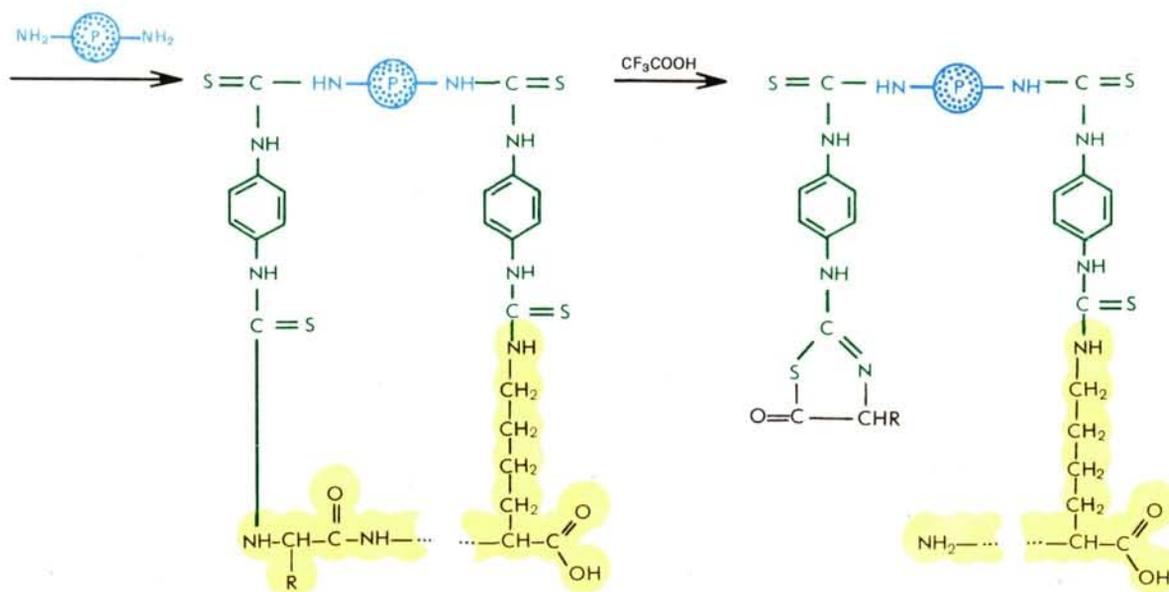
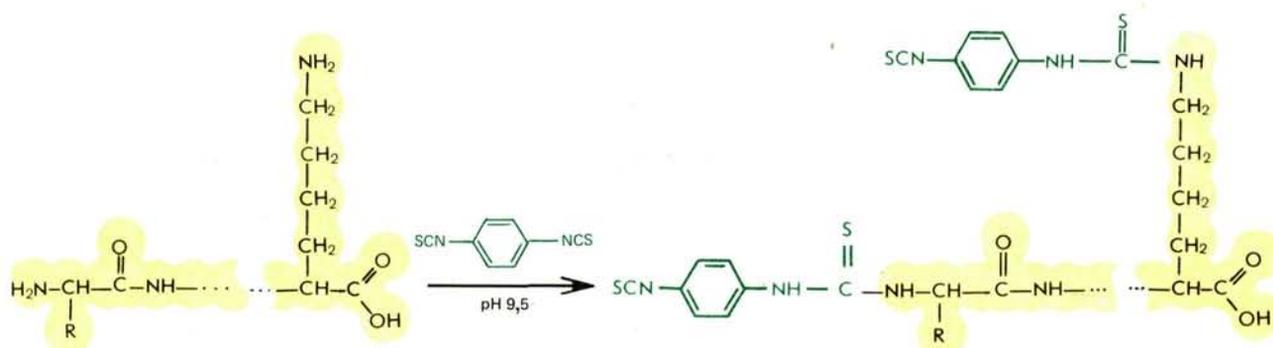


Метод применим также для пептидов, содержащих остатки аминокислоты и аргинина. Последние предварительно превращаются в остатки орнитина с помощью гидразиолиза.

Условия гидразиолиза являются достаточно жесткими (80 °С, 64%-ный гидразин, 10 мин), что приводит к частичному расщеплению пептидных связей, а общий выход реакции присоединения не превышает 30 — 55%.

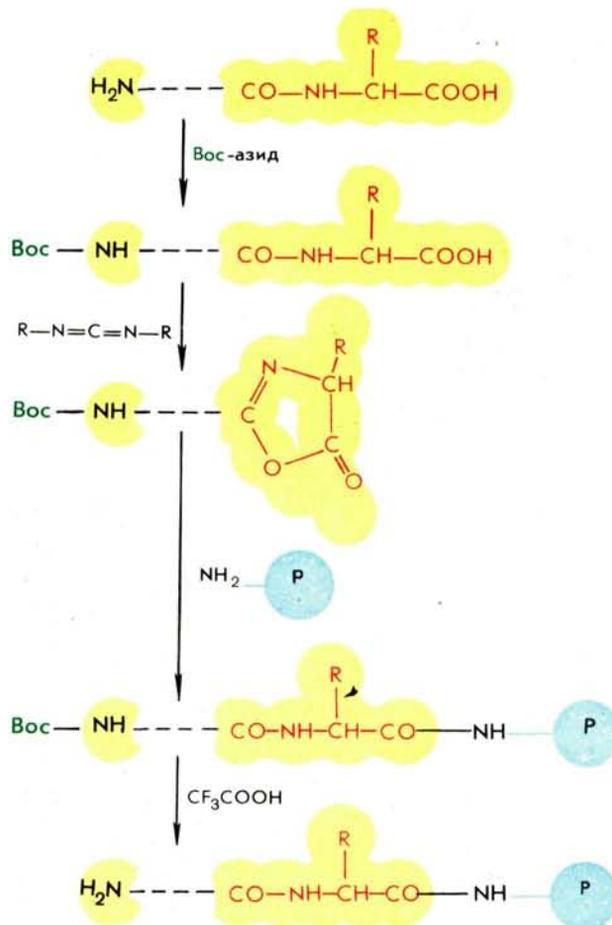
Пептиды, содержащие цистеин, могут быть ковалентно присоединены к специальному носителю с помощью реакции тиол-дисульфидного обмена (см. выше).

Наиболее общий вариант иммобилизации пептида — присоединение по С-концевой карбоксильной группе. В качестве конденсирующих агентов используются водорастворимые карбодиимиды (например, N-этил-N'-диметиламинопропилкарбодиимид). Как правило, α-аминогруппа пептида предварительно защищается с помощью легко удаляемой трет-бутоксикарбонильной группы или ФТК-группы, образующейся при реакции с ФИТЦ. В отличие от перечисленных выше методов, выходы при конденсации с помощью карбодиимида непредсказуемы и колеблются в диапазоне 0 — 90%. Легче других присоединяются к носителю короткие аргининсодержащие пептиды.





Худ (Hood) Лерой Е. (р. 1938), американский биохимик. Образование получил в Калифорнийском технологическом институте, в настоящее время — директор Ракового центра там же. Научные интересы связаны с изучением антигенов главного комплекса гистосовместимости. Создал ряд автоматических методов анализа первичной структуры белков.



Твердофазный секвенатор позволяет получать наилучшие результаты при анализе пептидов, содержащих от 5 до 40 аминокислотных остатков. Иногда он применяется и для изучения структуры более крупных пептидов и белков, особенно гидрофобных, легко вымываемых из реакторов жидкофазного прибора. С помощью этого метода удастся определять последовательность 20 — 25 аминокислотных остатков.

В 1981 г. Л. Худ и М. Ханкепиллер сконструировали новую модель секвенатора — газофазный секвенатор, предназначенный для анализа микроколичеств белков и пептидов. В приборе (рис. 20) исследуемый образец наносится на небольшой (диаметр 10 мм) диск из пористого стеклянного волокна, пропитанный полибренном. После высушивания диск зажимается между двумя стеклянными цилиндрами, образующими миниатюрную реакционную камеру (внутренний объем 0,05 мл) (рис. 21). Через капилляр в центре верхнего цилиндра (диаметр 0,5 мм) в реакционную камеру подаются необходимые реагенты (летучие — в газообразном состоянии), которые, проходя через поры диска, взаимодействуют с адсорбированным на нем белком или пептидом и далее выводятся через капилляр в нижнем цилиндре.

Нековалентная иммобилизация образца на пористой пластинке, уменьшение объема реакционной камеры и соответственно расхода реагентов и растворителей для промывок позволили сократить до

минимума потери материала в процессе деградации на газофазном секвенаторе и тем самым снизить количество анализируемого пептида или белка до уровня 100 — 500 пмоль.



Рис. 20. Газофазный секвенатор АР-03 (НТО АН СССР, г. Ленинград).

Ферментативные методы. Для определения структуры пептидов и белков можно применять ферменты, катализирующие отщепление N- и C-концевых аминокислотных остатков полипептидной цепи (аминопептидазы и карбоксипептидазы).

Гидролиз пептидов с помощью карбоксипептидаз является основным способом определения C-концевого остатка и C-концевой аминокислотной последовательности. При исследовании структуры пептидов и белков используются карбоксипептидазы А, В, С и Y. Карбоксипептидазы А (СРА) и В (СРВ) выделяют из поджелудочной железы крупного рогатого скота, карбоксипептидазу С (СРС) — из кожиры и листьев цитрусовых, карбоксипептидазу Y (СРУ) — из пекарских дрожжей.

Общим требованием к субстрату для всех карбоксипептидаз является наличие α -карбоксильной группы у C-концевой аминокислоты. Природа боковой цепи у отщепляемого аминокислотного остатка — основной фактор, определяющий скорость гидролиза пептидной связи. На скорость отщепления C-концевой аминокислоты в большой степени влияет также природа соседнего с ней остатка. Расположенные в соседнем положении аминокислотные остатки с ароматической или алифатической боковой цепью, а также остатки дикарбоновых аминокислот значительно ускоряют отщепление C-концевой аминокислоты. Напротив, если в соседнем положении находятся глицин и пролин, скорость гидролиза снижается.

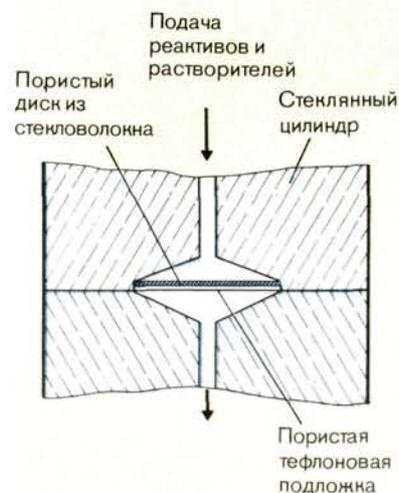


Рис. 21. Схема реакционной камеры газофазного секвенатора.

Скорости отщепления аминокислот карбоксипептидазами А и С

Тип отщепления	CPA	CPC
Быстрое отщепление	Tyr, Phe, Leu, Trp, Ile, Met, Thr, Gln, His, Ala, Val, HSer	Phe, Tyr, Trp, Leu, Ile, Val, His
Медленное отщепление	Asn, Ser, Lys, MetSO ₂ *	Ser, Thr, Met, Ala, Asp, Asn, Glu, Gln, Lys, Arg, Pro, CMCys
Очень медленное отщепление	Asp, Glu, Gly, CMCys, CysSO ₃ H	Gly
Не отщепляются	Pro, HyPro, Arg	HyPro

* MetSO₂ – метионинсульфон

Все аминокислоты по скорости отщепления их карбоксипептидазами А и С могут быть разделены на 4 группы (табл. 3).

Оптимальное значение рН для пептидазной активности составляет 7,0 — 9,0, оно меняется в зависимости от субстрата. Так, скорость отщепления С-концевых дикарбоновых аминокислот возрастает при снижении рН, тогда как скорость отщепления лизина возрастает при увеличении рН свыше 9,0.

Карбоксипептидаза В катализирует отщепление основных аминокислот (лизина и аргинина). Пептидная связь, образованная остатком аргинина, гидролизуется быстрее, чем связь, образованная остатком лизина. Для пептидазной активности оптимальное значение рН равно 8,0 — 9,0.

Карбоксипептидаза У отщепляет практически все аминокислоты, включая пролин, и ее специфичность аналогична специфичности CPC. Гидролиз проходит наиболее эффективно при рН 5,5 — 6,5. Оптимальное значение рН для отщепления лизина и аргинина — 7,0.

Как и другие карбоксипептидазы, СРУ наряду с пептидазной обладает и эстеразной активностью. Кроме того, СРУ присуща также амидазная активность, т. е. фермент может быть использован и для анализа пептидов, концевая карбоксильная группа которых амидирована.

С-Концевая аминокислотная последовательность определяется следующим образом: субстрат инкубируется с ферментом при 25 — 37 °С и через определенные интервалы времени из реакционной смеси отбираются аликвотные части, реакция останавливается подкислением и количество отщепленных аминокислот определяется на аминокислотном анализаторе. Построив график зависимости количества отщепленных аминокислот от времени (рис. 22), можно определить С-концевую последовательность. Таким образом удастся установить последовательность до 5 аминокислотных остатков.

Успешное определение структуры С-концевых участков пептидов и белков в значительной степени зависит от рационального выбора фермента и условий проведения процесса. Выбор карбоксипептидазы обуславливается природой исследуемого пептида. Очевидно, что

при анализе триптических пептидов, содержащих основные аминокислоты в качестве С-концевых остатков, целесообразно применять СРВ или смесь СРА и СРВ. Для идентификации С-концевых остатков химотриптических пептидов используют, как правило, СРА. Установление С-концевой последовательности фрагментов, полученных в результате гидролиза белка протеиназой из *St. aureus*, предпочтительнее проводить с помощью СРУ.

Пептидгидролазы, отщепляющие N-концевые аминокислотные остатки пептидов и белков, составляют группу аминопептидаз. Необходимым условием для действия аминопептидаз является наличие у субстрата свободной α -аминогруппы. Ферменты этой группы гидролизуют и дипептиды. В структурных исследованиях белков наибольшее применение нашли лейцинаминопептидаза (ЛАП) и аминопептидаза М (АПМ), выделяемые из почек свиньи.

ЛАП катализирует отщепление почти всех аминокислот, но с наибольшей скоростью — аминокислоты с объемными гидрофобными радикалами (Leu, Pe и Val). Пептидные связи, образованные N-концевыми остатками аргинина и лизина, слабо атакуются ЛАП, а связи остатка пролина вообще не гидролизуются.

АПМ в одинаковой степени катализирует гидролиз всех пептидных связей, за исключением связей, образованных остатками пролина. Кинетический анализ процесса гидролиза аминопептидазами позволяет определить последовательность 2 — 5 N-концевых аминокислотных остатков пептида или белка.

Существует группа ферментов, которые при гидролизе пептидов и белков отщепляют N- или С-концевые дипептидные фрагменты. К ним относятся катепсин С, или дипептидиламинопептидаза I (ДАП I), и катепсин В, или дипептидилкарбоксипептидаза. Процесс определения аминокислотной последовательности с помощью этих ферментов состоит из нескольких стадий: 1) гидролиз исследуемого соединения соответствующей дипептидазой, 2) разделение и идентификация отщепленных пептидов, 3) определение порядка расположения дипептидов в полипептидной цепи исследуемой молекулы.

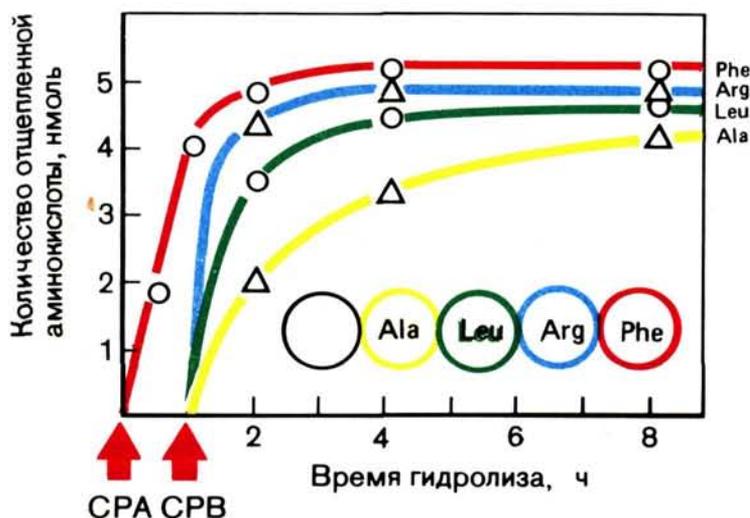


Рис. 22. Определение С-концевой последовательности пептида с помощью карбоксипептидаз.

Расположение дипептидов в полипептидной цепи определяют либо путем изучения кинетики отщепления дипептидов, либо с помощью так называемого метода «домино», принцип которого (рис. 23) заключается в том, что гидролиз с ДАП I проводят на исходном и укороченном (с помощью метода Эдмана) на один аминокислотный остаток пептиде. При этом получают дипептиды с перекрывающимися последовательностями аминокислот.

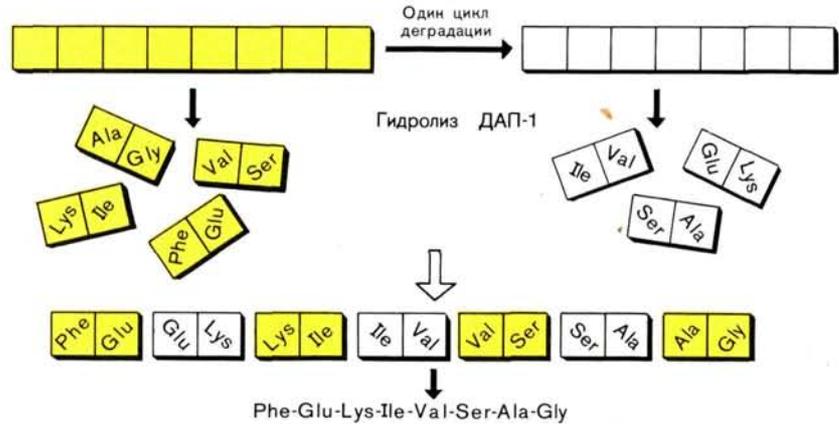


Рис. 23. Определение аминокислотной последовательности пептидов с помощью дипептидаминопептидазы I (принцип «домино»).

Масс-спектрометрический метод. Наряду с химическими и ферментативными методами для определения аминокислотной последовательности пептидов находят применение физико-химические методы, в частности масс-спектрометрия.



Рис. 24. Ионизация молекул электронным ударом.

Процесс съемки масс-спектра соединения состоит из нескольких стадий: переводение исследуемого образца в газообразное состояние; ионизация его, при которой происходит распад большинства образующихся молекулярных ионов; ускорение полученных ионов в электрическом поле, последующее их разделение (в зависимости

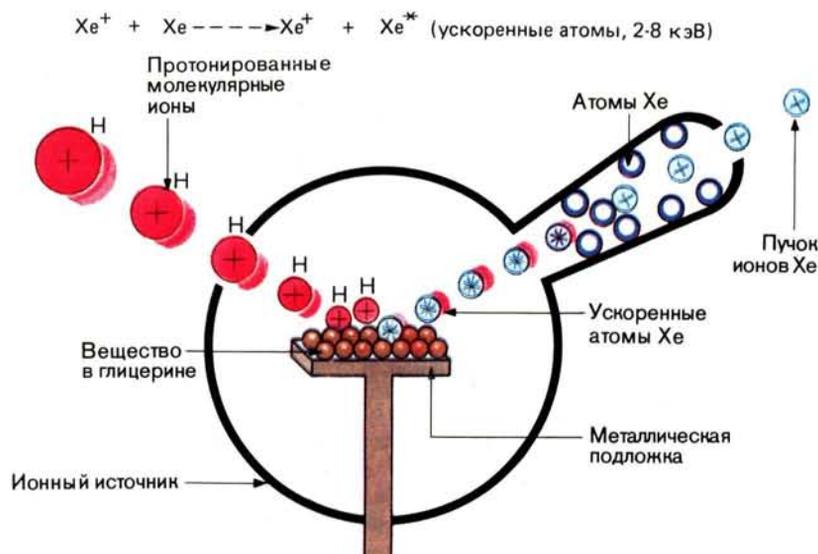


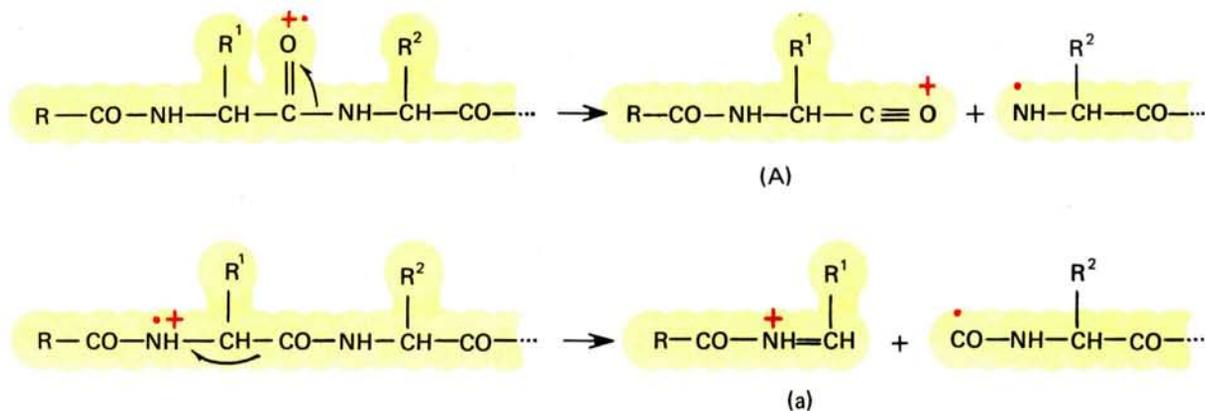
Рис. 25. Ионизация молекул ускоренными атомами Хе (или Аг).

от отношения массы к заряду) в магнитном поле; и наконец регистрация масс-спектра. Вследствие цвиттер-ионного характера пептиды с большим трудом подвергаются испарению. Летучесть их может быть повышена путем ацилирования и этерификации. Для ацилирования обычно используют трифторуксусный ангидрид или N-гидроксисукцинимидный эфир жирной кислоты, например декановой. Этерификацию можно осуществить метанолом в присутствии каталитических количеств хлористого сульфурила. В ряде случаев прибегают также к переметилированию атомов азота в пептидных связях путем обработки ацилированного пептида иодистым метилом и гидридом натрия в диметилсульфоксиде.

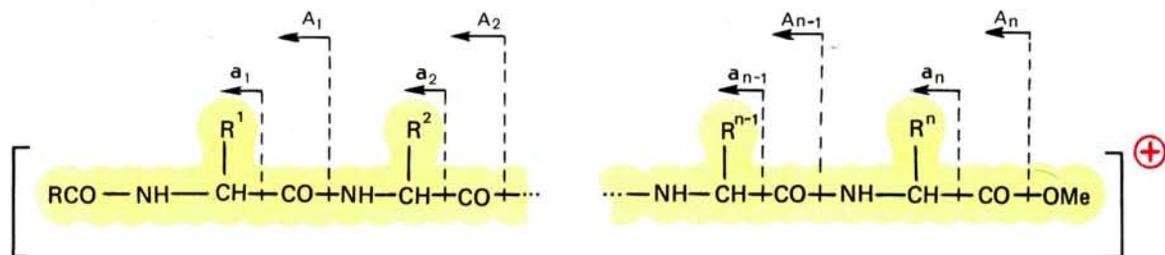
Для ионизации исследуемых молекул в масс-спектрометре используется несколько способов. Традиционным методом ионизации является бомбардировка электронами с энергией порядка 70 эВ (рис. 24). Применяется также ионизация ультрафиолетовыми лучами (фотоионизация) или положительно заряженными ионами (химическая ионизация). В последнее время разработаны новые методы — ионизация в сильных электрических полях (полевая ионизация или полевая десорбция), а также ионизация бомбардировкой ускоренными атомами (атомы Аг и Хе с большой кинетической энергией) (рис. 25). При использовании последних двух методов отпадает необходимость предварительного испарения исследуемого вещества, оно происходит одновременно с ионизацией.

В большинстве случаев в процессе ионизации происходит «выбивание» электронов из молекул испаренного вещества, в результате чего последние превращаются в положительно заряженные ионы. В молекулах пептидов легче всего ионизируются карбонильные

атомы кислорода и атомы азота пептидной связи. При распаде образующихся ионов преимущественно расщепляются связи, находящиеся в β -положении к положительному заряду. В результате такого распада из молекулярных ионов производных пептидов образуются аминокислотные (A) и альдиминные (a) фрагменты.



Поскольку в процессе первоначальной ионизации в молекулах исследуемого пептида положительный заряд оказывается локализованным на разных атомах кислорода или азота, при их дальнейшем распаде образуется набор всех возможных фрагментов аминокислотного и альдиминного типа фрагментации (A и a).



Идентификация пиков аминокислотных и альдиминных фрагментов в масс-спектре дает основную информацию о строении пептида (рис. 26).

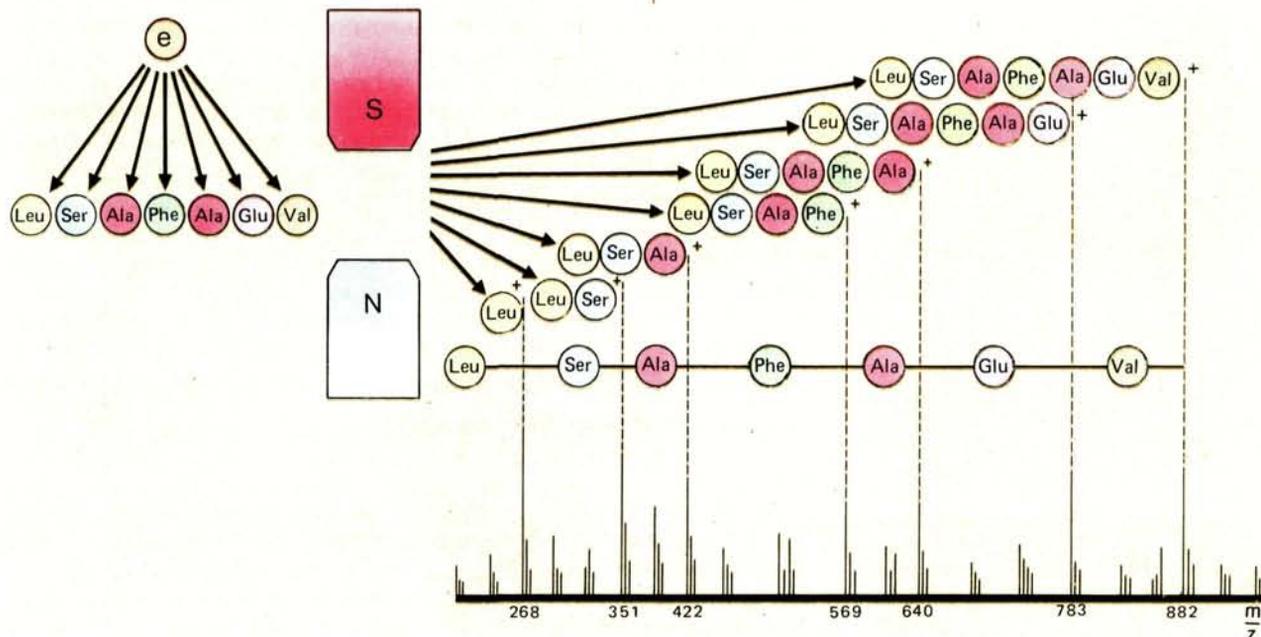
Аминокислотный тип фрагментации, конечно, не является единственным путем распада молекулярных ионов пептидов. Боковые цепи каждого аминокислотного остатка вносят свои специфические особенности в общую картину масс-спектра. Ионы фрагментов, образующихся в результате специфического распада боковых цепей, дают дополнительную информацию о структуре пептидов.

Одно из преимуществ масс-спектрометрического метода заключается в возможности анализировать пептиды, не содержащие свободной α -аминогруппы, и устанавливать химическую природу блокирующего остатка. При использовании электронной ионизации метод пригоден для анализа сравнительно коротких (4 — 6 остатков) пептидов. Границы возможностей масс-спектрометрии в изучении структуры пептидов резко расширились с введением более современных методов ионизации. Применив для этой цели бомбардировку ускоренными атомами, Г. Моррис показал, что можно получать масс-спектры пептидов, молекулярная масса которых достигает 3000, причем для определения структуры достаточно 1 — 5 нмоль вещества, т. е. в таком случае по чувствительности масс-спектрометрический метод не уступает другим методам.

Одним из достоинств бомбардировки ускоренными атомами, так же как и полевой десорбции, является исключение стадии предварительной модификации пептида. В настоящее время масс-спектрометрия с ионизацией бомбардировкой ускоренными атомами является одним из наиболее прогрессивных методов анализа структуры пептидов средней молекулярной массы (15 — 40 аминокислотных остатков). Особенно эффективно использование метода на завершающих стадиях анализа в сочетании с предварительным исследованием структуры пептида на секвенаторе.

При ионизации полевой десорбцией масс-спектры пептидов состоят практически из одних молекулярных ионов. На этой основе Я. Шимониши был разработан метод исследования структуры белка путем непосредственного анализа смеси пептидов, получаемых после ферментативного гидролиза. Смесь пептидов подвергается деградации по методу Эдмана, и после каждого этапа, наряду с идентификацией отщепленных аминокислот, масс-спектрометрически по молекулярным ионам определяются молекулярные массы

Рис. 26. Принцип масс-спектрометрического метода определения аминокислотной последовательности пептидов.



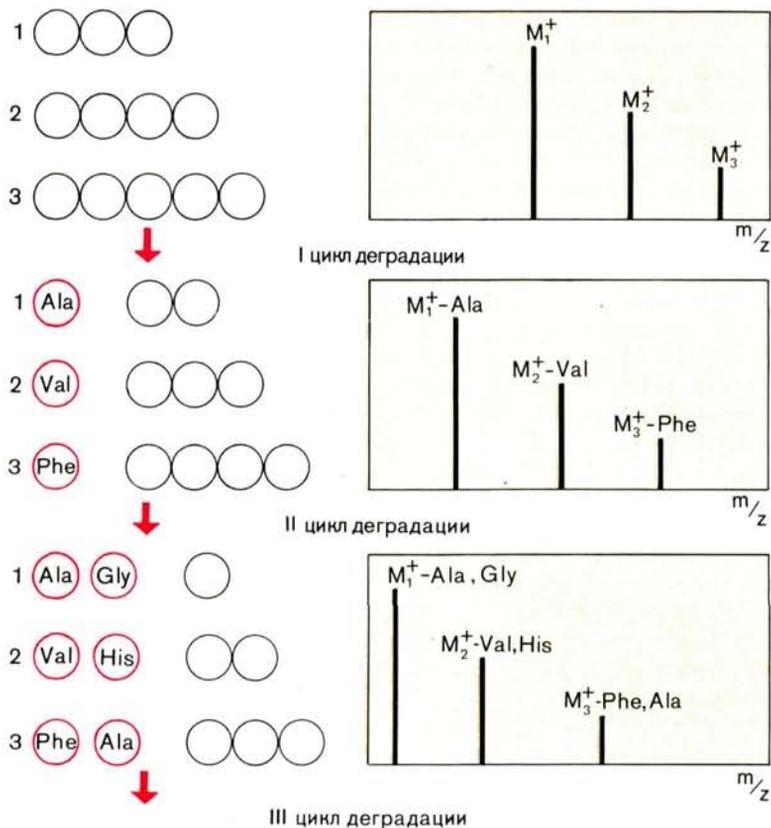


Рис. 27. Комбинация метода Эдмана и масс-спектрометрии в анализе структуры белка.

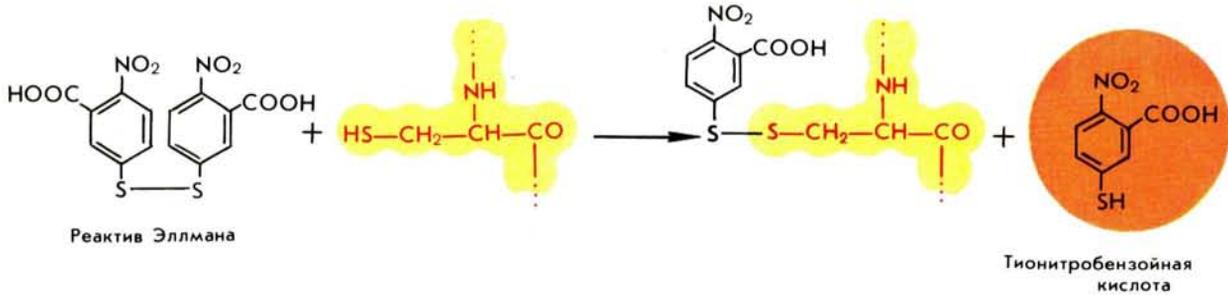
пептидов (рис. 27). Обработка полученных данных на ЭВМ позволяет в большинстве случаев однозначно устанавливать аминокислотную последовательность пептидов гидролизата. Метод особенно эффективен при сравнительном изучении структуры мутантных белков.

Хорошие результаты удается также получить при использовании масс-спектрометрии с ионизацией полевой десорбцией или бомбардировкой ускоренными атомами для анализа С-концевой последовательности пептидов в сочетании с ферментативным гидролизом с помощью карбоксипептидаз.

Анализ расположения сульфгидрильных групп и дисульфидных связей

Сульфгидрильные группы остатков цистеина играют важную роль в проявлении функциональной активности многих белков. В условиях, близких к физиологическим, они являются эффективными нуклеофильными реагентами, обладающими высокой реакционной способностью. Поэтому необходимо модифицировать свободные SH-группы белка на первом этапе изучения его структуры,

что обычно достигается с помощью реакции алкилирования (иодуксусной кислотой или ее амидом) или окисления надмуравьиной кислотой до цистеиновой кислоты. Те же реакции с последующим количественным анализом образующихся производных на аминокислотном анализаторе применяются и для предварительного определения числа свободных сульфгидрильных групп. Для этой цели используется также прямое титрование белка реактивом Эллмана [5,5'-дителио-бис-(2-нитробензойная кислота)] или дипиридилдисульфидом, приводящее к образованию смешанных сульфидов.



При реакции сульфгидрильных групп с реактивом Эллмана образуется тионитробензойная кислота, которая обладает сильным поглощением при 412 нм и может быть определена количественно спектрофотометрически.

Дисульфидные группы цистина менее реакционноспособны, однако они легко в щелочных условиях вступают в реакции дисульфидного или тиол-дисульфидного обмена:



Молекула белка, стабилизированная дисульфидными связями, устойчива к действию денатурирующих агентов и протеолитических ферментов. Поэтому при наличии в исследуемом белке дисульфидных связей необходимыми этапами работы являются их восстановление и последующая модификация или окисление с образованием стабильных производных цистеина. Число дисульфидных связей в белке определяется по разности суммарного содержания остатков цистеина и количества свободных сульфгидрильных групп.

Дисульфидные группы выполняют важные функции по поддержанию нативной конформации белковой молекулы. Локализация положений дисульфидных связей является обязательным этапом при определении первичной структуры белков.

Последовательность операций на этой стадии следующая: вначале проводится ферментативный гидролиз нативного белка в условиях, исключающих дисульфидный обмен (т. е. при pH ниже 7,0), полученная смесь пептидов фракционируется и у выделенных цистинсодержащих фрагментов после восстановления дисульфидной связи определяется аминокислотная последовательность. Разделе-



Нейрат [Neurath] Ганс (р. 1909), американский биохимик. Окончил Венский университет (1933), с 1950 г.— профессор биохимии Вашингтонского университета. Основные работы — по изучению структуры и функции белков, механизма действия протеаз.

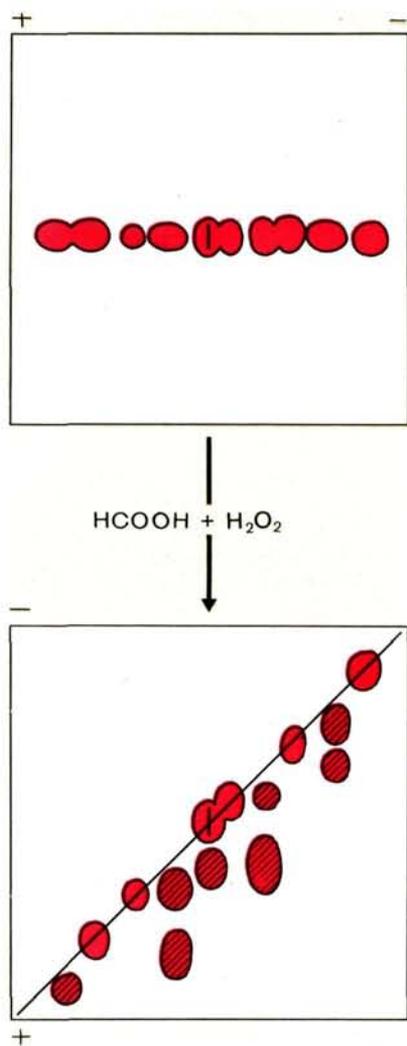


Рис. 28. Выделение цистинсодержащих пептидов методом диагонального электрофореза.

ние пептидов также необходимо проводить в кислой среде. На практике для выделения цистинсодержащих пептидов часто применяется метод диагонального электрофореза (рис. 28). По этому методу смесь пептидов наносится в центре листа хроматографической бумаги, проводится электрофорез в буфере с рН 3,6 или 6,5, полученная полоса обрабатывается парами надмуравьиной кислоты для перевода остатков полуцистина в цистеиновую кислоту, и затем повторно проводится электрофорез в тех же условиях, но в перпендикулярном направлении. При проявлении полученной карты нингидриновым реактивом пептиды, содержащие цистеиновую кислоту, обнаруживаются за пределами диагонали.

Стратегия и тактика исследования первичной структуры белков

Стратегия изучения первичной структуры белка, особенно на первых этапах, всецело определяется его аминокислотным составом и молекулярной массой. Дальнейший план исследования зависит от полученных результатов и должен подвергаться постоянной коррекции.

Стратегические принципы изучения первичной структуры белка претерпевали значительные изменения по мере развития и усовершенствования применяемых методов. Следует отметить три основных этапа в их развитии. Первый этап начался с классической работы Ф. Сенгера (1953) по установлению аминокислотной последовательности инсулина, второй — с широкого введения в структурный анализ белка автоматического секвенатора (начало 70-х годов) и, наконец, третий — с разработки скоростных методов анализа нуклеотидной последовательности ДНК (А. Максам, В. Гилберт, Ф. Сенгер, начало 80-х годов).

В классических работах 60-х — начала 70-х годов для расщепления белка использовались главным образом такие методы, которые позволяли получать большое число фрагментов небольшого размера. Структура их изучалась классическими методами анализа (ручной метод Эдмана, ДНС-Эдман, расщепление карбоксипептидазами и аминопептидазами). При этом для основного гидролиза применялся главным образом трипсин, а для получения перекрывающихся пептидов также использовались ферментативные методы гидролиза (химотрипсин, термолизин и пепсин).

С появлением в лабораториях секвенатора для расщепления белка стали применять химические методы, позволяющие получать крупные фрагменты: расщепление по остаткам метионина — бромцианом, триптофана — BNPS-скатолом, по связи аспарагинилглицил — гидроксиламиноом. Из ферментативных методов чаще использовался гидролиз трипсином белка, модифицированного по остаткам лизина, а также гидролиз стафилококковой протеиназой. Такой подход исключал кропотливую работу по выделению и установлению структуры большого числа мелких пептидов, что позволило во многих случаях резко ускорить проведение исследований.

В качестве примера использования классического подхода при определении первичной структуры белка может служить установление аминокислотной последовательности аспаратаминотрансферазы из сердечной мышцы свиньи (А. Е. Браунштейн, В. М. Липкин и др., 1972).

Аспаратаминотрансфераза относится к числу основных представителей фосфопиродоксальных ферментов, катализирующих реакции переаминирования, или трансаминирования. На первом этапе определения аминокислотной последовательности этого фермента были использованы исчерпывающий триптический гидролиз карбоксиметилированного образца и ограниченный триптический гидролиз (только по остаткам аргинина) малелированного и карбоксиметилированного образца, что позволило в конечном итоге выделить и идентифицировать все пептиды, составляющие полипептидную цепь белка. Нахождение перекрывающихся пептидов с целью реконструкции полипептидной цепи аспаратаминотрансферазы потребовало применения нескольких ферментативных и химических методов расщепления белковой молекулы.

Недостаточная информативность каждого из этих методов в отдельности была связана с трудностью выделения всех необходимых пептидов и с наличием в полипептидной цепи белка однотипных повторяющихся последовательностей.

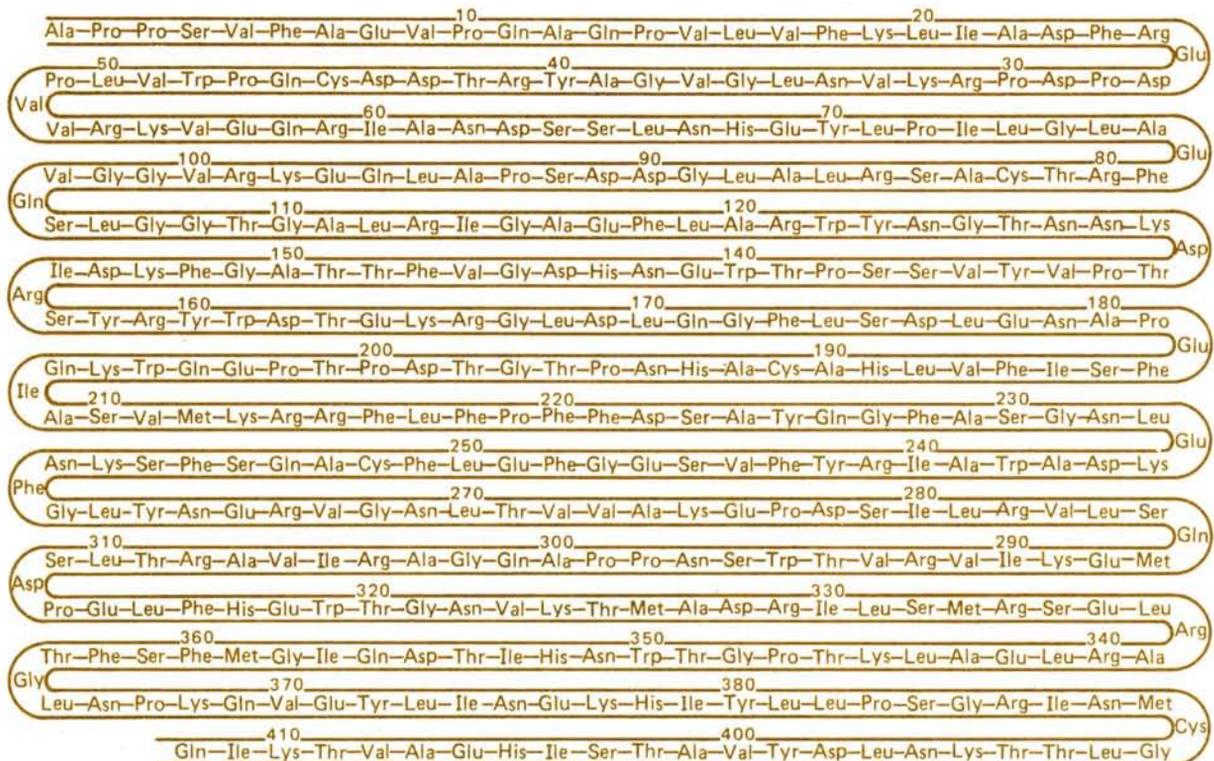
Аминокислотная последовательность аспаратаминотрансферазы изображена на рисунке 29. Этот фермент содержит две одинаковые полипептидные цепи, построенные из 412 аминокислотных остатков каждая. Молекулярная масса одной полипептидной цепи равна 46 344, а всего холофермента (с учетом двух молей пиридоксальфосфата) — 93 147.

Широкое использование секвенатора можно проиллюстрировать на примере опубликованной в 1973 г. К. Уолшем, Г. Нейратом и сотр. работы по определению первичной структуры свиного трипсина. Общая стратегия исследования представлена на рисунке 30.

Прямым исследованием свиного β -трипсина с помощью секвенатора удалось определить последовательность первых 39 аминокислотных остатков (аминокислоты с 7 по 45, нумерация аминокислот, как у бычьего трипсиногена). Образец β -трипсина содержал примесь α -трипсина, образующегося в результате разрыва связи Lys—Ser (131 — 132) при автолизе. Анализ С-концевого фрагмента (α -С) на секвенаторе позволил установить последовательность аминокислотных остатков с 132 по 171.

Содержащий два остатка триптофана N-концевой фрагмент α -трипсина (α -N) был обработан BNPS-скатолом. Из образовавшейся смеси пептидов выделялся фрагмент (41 — 127), при исследовании которого была установлена последовательность аминокислот с 41 по 75 остаток. Далее молекула β -трипсина расщеплялась бромцианом по остаткам метионина и гидроксиламином по связи Asn — Gly и гидролизовалась трипсином по остаткам аргинина после предварительного блокирования ϵ -аминогруппы остатков лизина с помощью янтарного ангидрида. Два

Рис. 29. Аминокислотная последовательность цитоплазматической аспаратаминотрансферазы из сердечной мышцы свиньи.





Уолш (Walsh) Кеннет (р. 1931), американский химик-биоорганик. Окончил Торонтский университет (1959), в настоящее время работает в Университете шт. Вашингтон (Сиэтл). Основные работы — по выяснению взаимосвязи между структурой и функцией белков. Разработал эффективные подходы к выяснению первичной структуры белков. Определил аминокислотные последовательности ряда протеолитических ферментов, факторов свертывания крови, фосфодиэстераз и других белков.

последних метода расщепления использовались также при изучении С-концевого фрагмента α -трипсина (α — С) и N-концевого бромцианового фрагмента (СВ — N). Во всех случаях аминокислотная последовательность выделенных пептидов исследовалась с помощью секвенатора. Таким образом, была установлена практически полная первичная структура (кроме остатков 228 и 229) свиного трипсина.

В изучении первичной структуры белков достигнут значительный прогресс. Ежегодно устанавливается полная структура около 100 новых белков. Определены аминокислотные последовательности таких сложных ферментов, как гликогенфосфорилаза и β -галактозидаза, содержащих соответственно 841 и 1021 аминокислотных остатков в одной полипептидной цепи. Наряду с этим

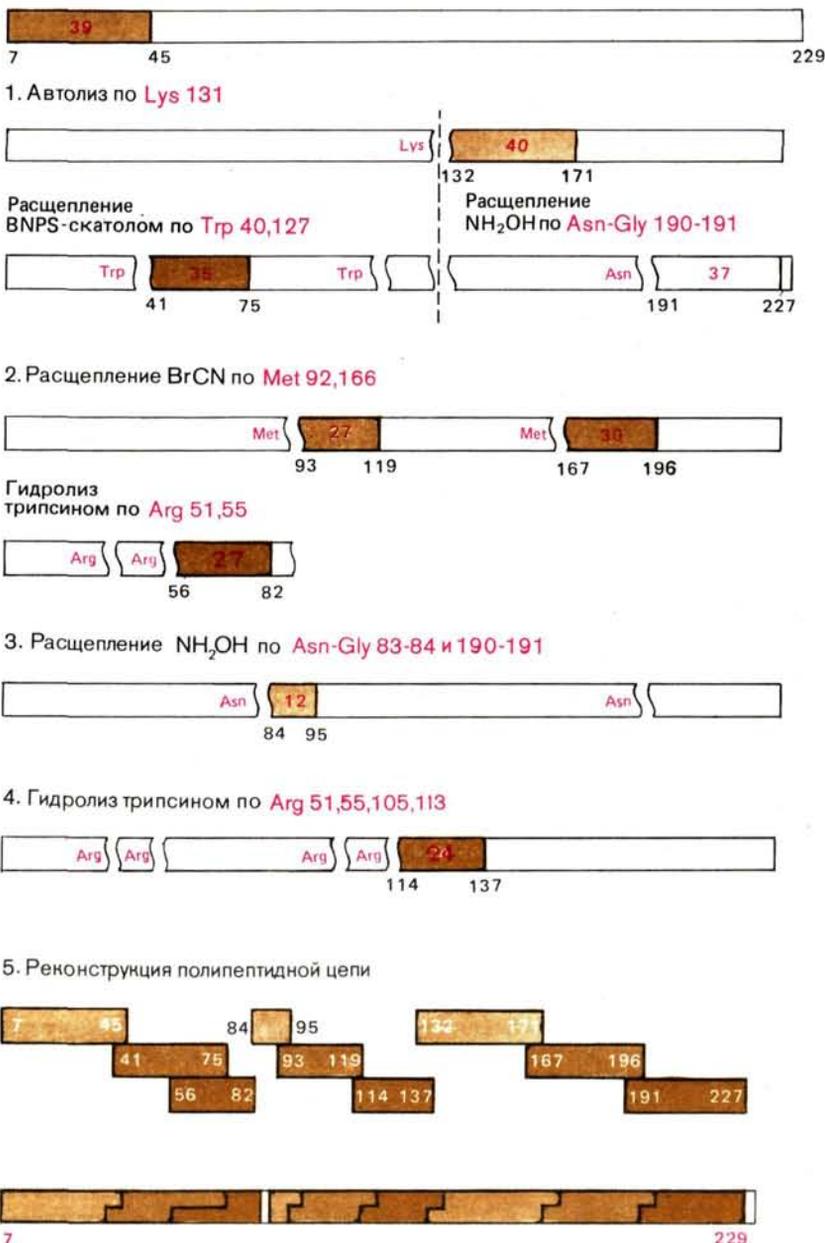


Рис. 30. Схема установления первичной структуры трипсина. Окрашены участки полипептидной цепи, структура которых определена с помощью секвенатора.

в структурной химии белка в настоящее время имеются определенные проблемы. Наибольшие сложности возникают у исследователей, имеющих дело с мембранными белками, белками, выделяемыми в ничтожно малых количествах, и с белками большой молекулярной массы ($M > 100\,000$).

При изучении мембранных белков необходимо принимать во внимание присущие им необычные свойства. Высокое сродство этих белков к липидам и гидрофобность приводят к практически полной их нерастворимости в водных средах. Пептидные фрагменты, полученные при гидролизе мембранных белков, также плохо растворимы и обладают повышенной склонностью к агрегации. Эти и некоторые другие сложности встретились при исследовании структуры бактериородопсина — основного белка пурпурной мембраны галофильной бактерии *Halobacterium halobium*.

Уменьшение количества белков и пептидов, необходимых для анализа их структуры, является одной из центральных проблем, стоящих перед исследователями. С целью ее решения ведется поиск новых методов изучения структуры, в частности более чувствительных способов идентификации производных аминокислот (см. с. 61). Один из перспективных подходов заключается в широком использовании радиоактивных методов анализа. В ряде лабораторий при деградации пептидов в секвенаторе применяется радиоактивный ^{35}S - или ^{14}C -ФИТЦ. Можно вводить радиоактивную метку непосредственно в анализируемый белок. Для многих белков это достигается добавлением радиоактивно меченных аминокислот непосредственно в питательную среду, на которой выращивается культура, являющаяся источником исследуемого белка. Таким же путем оказывается возможным радиоактивно метить белок избирательно по определенным аминокислотным остаткам. Если белок, радиоактивно меченный, например, по остаткам лейцина, анализировать с помощью секвенатора, то простое измерение радиоактивности экстрактов, содержащих анилинотиазолиноны, позволяет безошибочно определить, в каких положениях полипептидной цепи в N-концевой области белка расположены остатки лейцина (рис. 31). Аналогичным образом можно определить положение и других аминокислотных остатков. Такой прием используется для анализа N-концевой последовательности предшественников белков, доступных лишь в ничтожно малых количествах. Для исследования полной структуры он, однако, не применяется из-за дороговизны и трудоемкости.

Особые задачи возникают при исследовании первичной структуры сверхкрупных белков (молекулярная масса более 100 000), поскольку с ростом молекулярной массы все сложности увеличиваются в геометрической прогрессии. Один из возможных подходов в этом случае заключается в использовании ограниченного протеолиза для расщепления исходного белка на небольшое число фрагментов средней молекулярной массы (20 000 — 40 000) и в последующем исследовании фрагментов как отдельных белков.

Этот прием был использован при определении структуры фактора элонгации биосинтеза белка EF—G (Ю. Б. Алахов и др., 1976). Инкубирование EF—G ($M\ 81\,000$) в нативном состоянии с трипсином приводит к образованию четырех сравнительно устойчивых к дальнейшему действию трипсина фрагментов T_4 , T_5 , T_6 и T_7 ($M\ 41\,000$, $27\,000$, $8\,000$ и $3\,000$ соответственно). Фрагменты были выделены в гомогенном виде, установлено их строение и расположение в полипептидной цепи белка (рис. 32).

Развитие методов анализа нуклеотидной последовательности ДНК сделало возможным на основе генетического кода выводить соответствующие аминокислотные последовательности исходя из установленных нуклеотидных. При реализации такого подхода

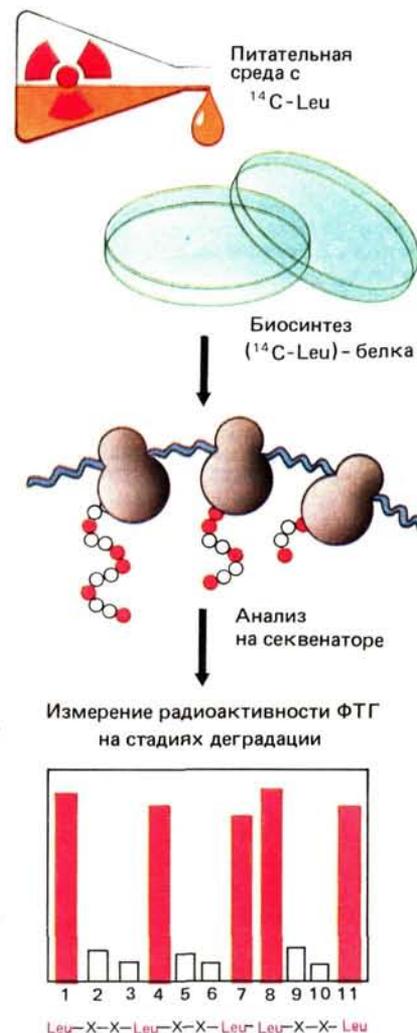


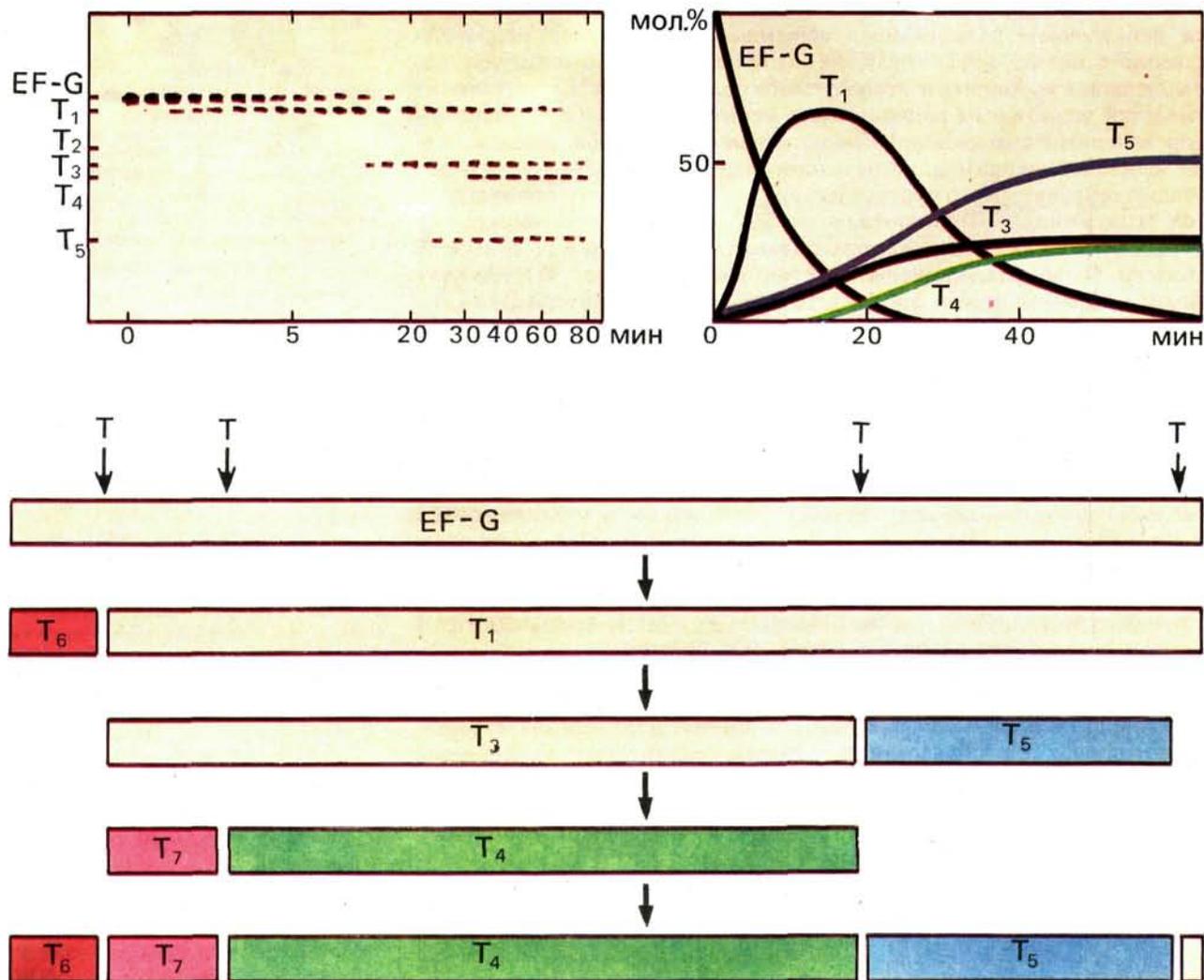
Рис. 31. Анализ аминокислотной последовательности белка, радиоактивно меченного по отдельным аминокислотам.

следует, однако, иметь в виду целый ряд ограничений и возможные источники ошибок. Во-первых, выведенная из нуклеотидной аминокислотная последовательность может не соответствовать реальной вследствие процессинга, который часто происходит как на уровне информационной РНК, так и при превращении белка-предшественника в конечный белок. Во-вторых, лишь одна ошибка в определении последовательности ДНК (пропуск или вставка) приводит к выведению совершенно неправильной аминокислотной последовательности белка.

Таким образом, установление первичной структуры ДНК не всегда может заменить непосредственное исследование аминокислотной последовательности кодируемого ею белка. В то же время параллельное изучение первичных структур белка и ДНК чрезвычайно эффективно.

Установление нуклеотидной последовательности дает возможность расположить изученные пептидные фрагменты в непрерывную полипептидную цепь, позволяя решать, таким образом, наиболее сложную задачу структурного анализа белка. С другой стороны,

Рис. 32. Ограниченный гидролиз трипсином фактора элонгации EF-G. Кинетика образования триптических фрагментов (вверху) и их расположение в полипептидной цепи белка (внизу).



данные по аминокислотной последовательности пептидов упрощают и уточняют анализ нуклеотидной последовательности. Параллельное изучение первичных структур белка и ДНК было использовано, в частности, при определении аминокислотной последовательности β - и β' -субъединиц ДНК-зависимой РНК-полимеразы *E. coli*, полипептидные цепи которых состоят из 1342 и 1407 аминокислотных остатков соответственно (В. М. Липкин, Е. Д. Свердлов и др., 1980).

В последние годы анализ первичной структуры белков на основе исследования нуклеотидной последовательности соответствующих генов принимает все большие масштабы. Первоначально такие исследования касались белков прокариотических организмов, в основном *E. coli*, генетика которых хорошо изучена, и получение структурных генов не представляло большого труда. По мере развития методов генной инженерии появилась возможность выделять также структурные гены белков эукариот.

Во многих ведущих лабораториях мира созданы так называемые банки или библиотеки генов многих высших животных и человека. В этих банках гены разнообразных белков хранятся в составе специальных векторов — плазмид или фагов. Для выделения соответствующего гена из банка используются гибридизационные зонды — небольшие нуклеотидные фрагменты, синтезированные на основе установленной аминокислотной последовательности пептидов исследуемого белка. Из-за «вырожденности» генетического кода могут использоваться не любые последовательности для этой цели. Подходящими являются пептиды, содержащие в своем составе аминокислоты, представленные одним или двумя кодонами, поскольку в этом случае минимально число различных вариантов олигонуклеотидов, способных кодировать данный пептид. Оптимальными являются пептиды, содержащие остатки метионина и триптофана, кодируемые уникальными кодонами. Поэтому особое значение приобретают исследования по выделению и изучению таких пептидов. Имеются и другие методические подходы для выделения структурных генов белков, связанные, в частности, с их способностью в определенных условиях экспрессироваться. Синтезируемый в результате экспрессии белок может быть идентифицирован, например, с помощью иммунохимических методов (см. с. 439).

Возможности современных методов генной инженерии открыли широкие перспективы для изучения белковых систем, которые еще вчера казались недоступными для исследователей вследствие их чрезвычайно низкого содержания. В частности, совсем недавно Ш. Нуме удалось определить структуры ацетилхолинового рецептора и основного компонента натриевого канала из электрического органа рыбы *Electrophorus electricus*.

Сегодня известны первичные структуры более 2000 белков, причем все возрастающая информация поступает из анализа нуклеотидной последовательности генов. Для тех, кто старается более глубоко понять язык аминокислотных последовательностей, доступен уже огромный материал — обширный текст, который в целом представляет собой существенные фрагменты «книги жизни». Что может дать более глубокий его анализ? Бесспорно, он совершенно необходим в изучении связи между строением и функцией отдельных представителей пептидно-белковой природы. Но, может быть, он приведет нас к открытию более общего «белкового кода», позволит нам в будущем в той или иной мере предсказывать свойства белков по их первичной структуре. Это уже можно делать достаточно успешно в отношении пространственной структуры. А биологическая роль? Вряд ли природа придумала аминокислотный алфавит из 20 букв случайно. Есть над чем подумать, и все возрастающий поток новых данных по аминокислотным последовательностям отнюдь не делает каждый новый шаг в этом направлении более скучным, — напротив, он воодушевляет нас, рождает новые пути и концепции и вновь и вновь обращает нас к вопросу о тайне химической азбуки живого.



Липкин Валерий Михайлович (р. 1942), советский химик-биоорганик. Окончил Московский химико-технологический институт им. Д. И. Менделеева (1964), с 1965 г. работает в Институте биоорганической химии им. М. М. Шемякина АН СССР. Основные работы — в области изучения химической структуры белков. Лауреат Государственной премии СССР (1982).



Нума (Numa) Шосаку (р. 1929), японский биохимик. Окончил университет Киото (1952); работал в США и ФРГ (1956—1967), с 1968 г. — профессор университета Киото. Широко известен работами по установлению первичной структуры мембранных белков с помощью методов генной инженерии (ацетилхолиновый рецептор, Na^+ -канал возбудимых мембран, трансдуцин и др.).

Пространственное строение белков и пептидов

Каждый белок или пептид специфическим образом свернут в пространстве, и эта конформация определяет его физико-химические и биологические свойства. Пространственная структура белка (пептида) в целом кодируется его первичной структурой. Эта взаимосвязь создает предпосылки для теоретических расчетов и предсказаний вторичной структуры белков на основе их аминокислотной последовательности. Пространственная структура достаточно подвижна, т. е. способна изменяться под воздействием внешних условий или различных агентов, и в этом смысле правильнее говорить о предпочтительной конформации белка или пептида, об одной из многих, энергетически наиболее выгодной пространственной структуре. Среда, даже наиболее естественная, не может не вызывать ответной реакции белковой молекулы, и особенно тех ее группировок, которые расположены на поверхности глобулы и участвуют в многочисленных взаимодействиях. В живой клетке белок находится в постоянно меняющемся окружении и вынужден как-то перестраиваться, когда ему приходится вступать в контакт с соседними белками, рецепторами или такими постоянными партнерами, как нуклеиновые кислоты, липиды, полисахариды, ионы металлов и другие низкомолекулярные соединения. Поэтому естественно стремление исследователя получить более полную информацию о динамических характеристиках белковой молекулы. Образно говоря, он хочет видеть не фотографию, а цветной кинофильм обо всех приключениях и превращениях функционирующей молекулы белка.

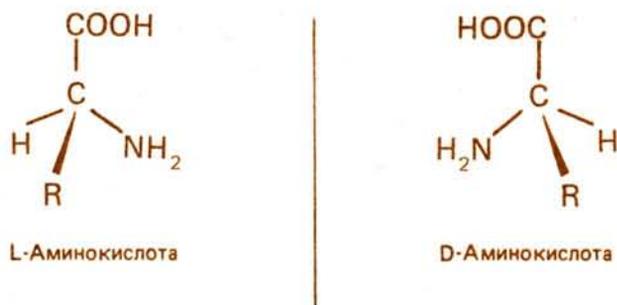
Первостепенное значение имеет выяснение конформации нативного белка, которая определяет специфичность биологического действия. Поскольку условия эксперимента при анализе пространственного строения пептидно-белковых веществ обычно отличаются от условий, в которых они функционируют *in vivo*, в каждом случае необходимо строго доказывать, что исследуемая предпочтительная конформация в целом сохраняется в широком диапазоне параметров среды (например, в растворе или кристалле).

Таким образом, выяснение пространственного строения пептидов и белков представляет собой достаточно сложную задачу. В некоторых случаях трехмерная структура конкретного соединения может быть выяснена на основе какого-либо одного метода (например, с помощью рентгеноструктурного анализа кристаллического белка). При исследовании пептидов и небольших белков в растворах хорошие результаты дает сочетание ряда физико-химических методов. Иногда ценную информацию можно получить на основе применения, наряду с экспериментальными подходами, теоретических расчетных методов.

В белках, как уже отмечалось, различают несколько уровней пространственной организации, т. е. вторичную, третичную и четвертичную структуры. Хотя эти понятия несколько устарели для белков, а для пептидов не применяются вообще, ими пользуются ради преемственности, поскольку в конечном счете представляет интерес полное описание пространственного строения данного белка или пептида с точными координатами атомов, со всеми конформационными переходами — в непосредственной связи с выполняемой биологической функцией.

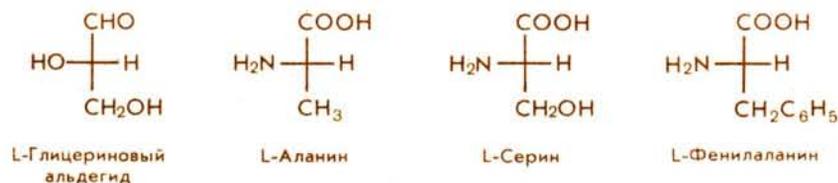
Стереохимия аминокислот. Все встречающиеся в белках аминокислоты (кроме пролина) могут быть изображены формулой $\text{NH}_2\text{CHR}\text{COOH}$, где R — радикалы различной природы. В общем случае это соединения с асимметрическим атомом углерода, и,

следовательно, каждая аминокислота может существовать в пространстве в виде двух форм — с L- и D-конфигурацией асимметрического центра.



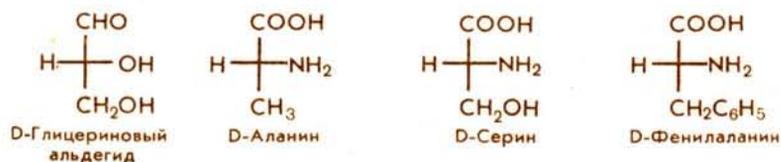
Принадлежность аминокислот к L- или D-ряду в случае простейших представителей (аланин, серин) доказывается прямым сведением их к соответствующему глицериновому альдегиду с помощью стереоспецифических превращений.

В состав всех белков входят только L-аминокислоты (исключение составляет оптически неактивный глицин), которые могут быть представлены в виде проекционных формул Фишера:



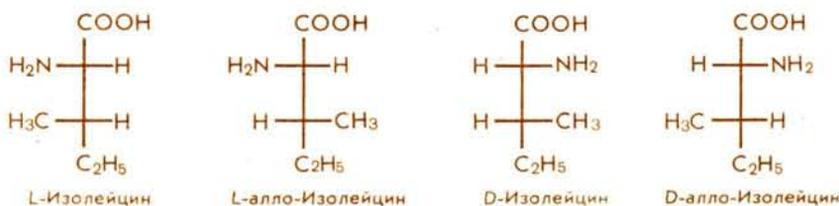
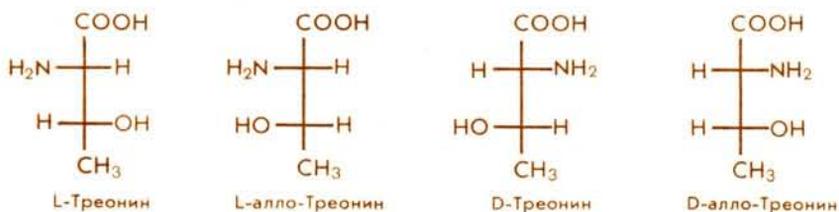
Принадлежность к L-ряду не обязательно связана с определенным направлением вращения плоскости поляризованного света: L-аминокислоты имеют как положительное, так и отрицательное вращение в зависимости от радикала R и условий исследования.

Противоположную конфигурацию имеют D-аминокислоты:

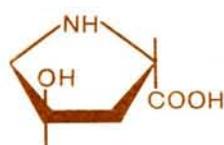


Остатки D-аминокислот входят в состав многих природных пептидов, прежде всего антибиотиков. В частности, в грамицидин S входит D-фенилаланин, в грамицидин A — D-валин, D-лейцин, D-триптофан, в актиномицин D — D-изолейцин, в полимиксин — D-серин. D-Пролин встречается в эргоалкалоидах.

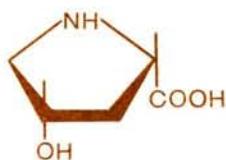
Некоторые аминокислоты имеют два асимметрических углеродных атома, что обуславливает возможность существования четырех оптически активных стереомерных форм (2^n , где n — число асимметрических атомов). Эти формы проиллюстрированы на схеме для треонина и изолейцина.



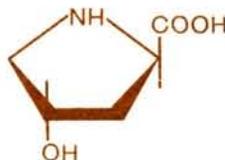
Появление заместителя в пирролидиновом кольце пролина также приводит к образованию алло-форм, в которых заместитель (гидроксигруппа) и карбоксильная группа находятся в *цис*-положении.



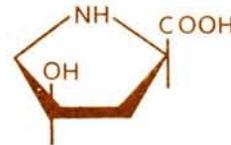
L-Гидроксипролин



L-алло-Гидроксипролин



D-Гидроксипролин



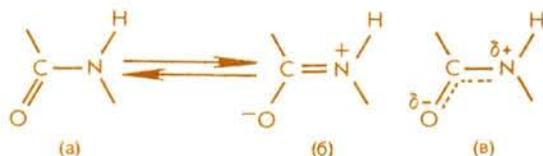
D-алло-Гидроксипролин

При кислотном гидролизе белков получается смесь L-аминокислот, которые с помощью дробной кристаллизации или хроматографии могут быть выделены в чистом виде. Аналогично при гидролизе ряда природных пептидов (грамицидины A и S, актиномицин и т. п.) можно получить и соответствующие чистые D-аминокислоты.

Часто аминокислоты для исследовательских целей и практических нужд получают с помощью микробиологического синтеза (лизин и др.) — тогда продуктами являются L-изомеры. Если же пользуются химическим синтезом, то обычно образуются смеси L- и D-изомеров аминокислот, т. е. рацематы. Для их разделения используются различные приемы. Одним из наиболее распространенных является избирательный гидролиз ферментами (ацилазами, эстеразами и т. п.) N-ацетил-D,L-аминокислот или соответствующих сложных эфиров D,L-аминокислот; в этом случае расщеплению подвергается лишь L-форма и, таким образом, в растворе образуются свободные L-аминокислоты, которые легко отделяются от стабильных по отношению к ферментативному гидролизу производных D-аминокислот.

Другим приемом является образование солей D,L-аминокислот с оптически активными агентами, например алкалоидами бруцином и стрихнином, а также другими оптически активными аминами, производящимися в промышленных масштабах (амфетамин и др.). В силу различной растворимости соответствующих диастереомерных солей (D,L и L,L) они разделяются путем кристаллизации или дробного осаждения и при последующем разложении кислотами образуют оптически чистые L- и D-аминокислоты. Эти методы, ранее широко применявшиеся в лаборатории, постепенно утрачивают свое значение. В производственных условиях для разделения рацемических аминокислот все шире используются хроматография на оптически активных адсорбентах и иммобилизованные ферменты.

Пептидная связь. Главной структурной единицей белков и пептидов является пептидная (амидная) связь $—CO—NH—$. Согласно современным представлениям, пептидная связь в белках является практически плоской, ее основные параметры приведены на рисунке 33. В обычных условиях наблюдаются лишь небольшие отклонения от плоской системы (до $5—10^\circ$); большие деформации возможны в напряженных циклических системах. Пептидная связь примерно на 10% короче обычной, простой C—N и имеет характер «частично двойной» связи $—C=N—$. При изучении этой проблемы Л. Полинг и Р. Кори, анализировавшие методом рентгеноструктурного анализа ряд модельных ди- и трипептидов, предложили в 1948—1955 гг. объяснять особую природу связи C—N «резонансом» между двумя формами пептидной связи *a* и *б*.



Другими словами, в белках и пептидах связь C—N является частично кратной (как это показано структурой *в*) из-за взаимодействия неподеленной пары электронов атома азота с π -электронной системой карбонильной группы, что приводит к затрудненному вращению вокруг связи C—N (барьер вращения составляет $63—84$ кДж/моль).

Обычно пептидная связь имеет *транс*-конфигурацию, т. е. является транспланарной (рис. 33, *a*). В напряженных циклических системах (некоторые циклопептиды, производные пролина и т. п.),

а также при большом размере заместителей у атома азота в N-алкилированных производных пептидная связь может существовать в плоской *цис*-форме (рис. 33,б). *Цис*- и *транс*-пептидные связи можно различить с помощью физических методов (ИК-, ЯМР-спектроскопии и др.). В белках пептидная связь практически всегда имеет *транс*-конфигурацию.

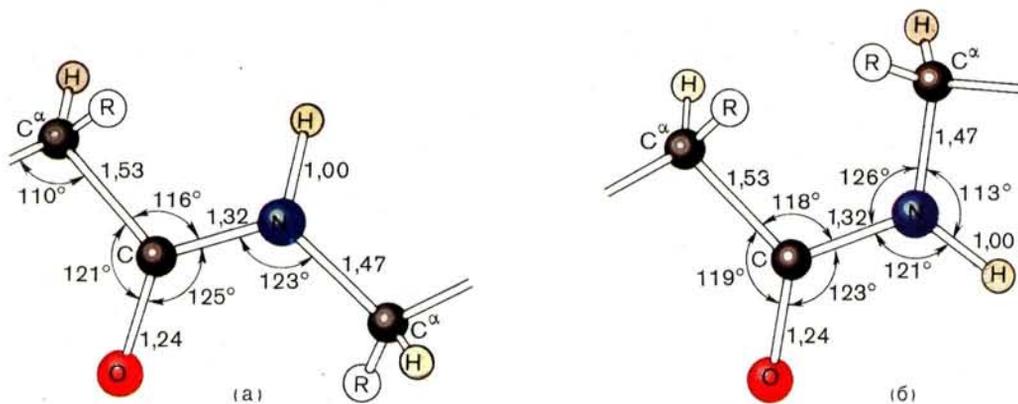


Рис. 33. Валентные углы и длины связей (в нм) в *транс*- и *цис*-пептидных связях (а и б соответственно).

Рассмотрим теперь фрагмент пептидной цепи, включающий две плоские пептидные связи с подвижным (своего рода шарнирным) сочленением в точке, где находится асимметрический углеродный атом (рис. 34).

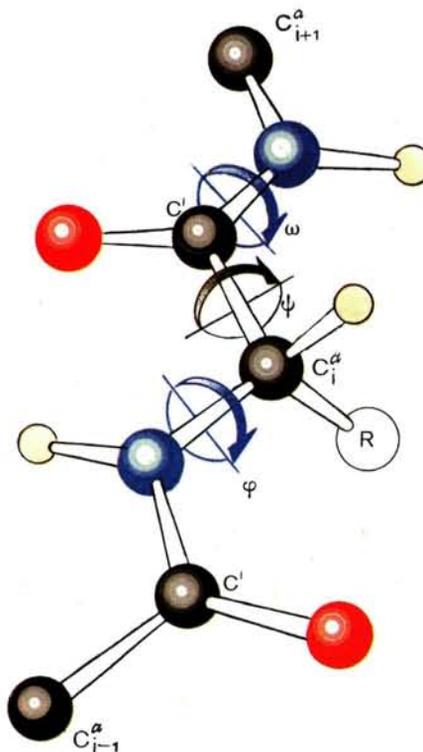


Рис. 34. Определение двугранных углов в полипептидной цепи.

В этом звене пептидной цепи повороты возможны вокруг двух простых связей $N-C^{\alpha}$ и $C^{\alpha}-C'$, примыкающих к асимметричному атому. Согласно принятой номенклатуре, такие повороты измеряются двугранными углами $\varphi(N-C^{\alpha})$ и $\psi(C^{\alpha}-C')$; нередко используются также углы ω (вращение вокруг пептидных связей $C'-N$), а также χ^1, χ^2 и др. (вращение вокруг связей $C^{\alpha}-C^{\beta}, C^{\beta}-C^{\gamma}$ и т. д.). В качестве нулевой точки отсчета принимается конформация (рис. 35), в которой $\varphi = \psi = \omega = 0^{\circ}$ (заслоненное расположение остатков основной пептидной цепи). Направление отсчета углов — положительных (до $+180^{\circ}$) и отрицательных (до -180°) — на рисунке 35 показано стрелками.

Легко понять, что любые конформации пептидной цепи могут быть описаны набором значений углов φ и ψ у каждого из C^{α} -атомов (обычно $\omega = 180^{\circ}$); другими словами, знание таких значений для всех пептидных звеньев эквивалентно полной информации о пространственном строении основной цепи белка и пептида.

Графически конформационные параметры полипептидной цепи удобно изображать с помощью карт, предложенных Г. Рамачандраном в 1963 г. («карты Рамачандрана») и отражающих зависимость энергии остатка от параметров φ и ψ (рис. 36). Значения углов φ и ψ откладываются по осям координат от -180° до $+180^{\circ}$. В силу взаимодействия между заместителями в пептидной цепи углы φ и ψ не могут принимать любые значения — для них разрешенными оказываются лишь некоторые дискретные области (выделенные на карте темным цветом), которые соответствуют энергетически выгодным конформациям пептидной цепи, т. е., по существу, являются областями минимума энергии. Их достаточно компактная локализация свидетельствует о том, что углы φ и ψ взаимосвязаны, изменение одного из них влечет изменение второго. Например, если угол ψ приобретает значение в интервале $60 - 120^{\circ}$, то для угла φ энергетически выгодным оказывается значение, не превышающее -60° .



Рамачандран [Ramachandran] Гопалачандрам Нараяна (р. 1922), индийский биофизик. Образование получил в Мадрасе (Индия) и Кембридже (Великобритания); профессор Мадрасского университета (1950), с 1970 г. возглавляет Отдел молекулярной биофизики Индийского института науки. Известен работами по пространственной структуре белков. Заложил основы теоретического конформационного анализа пептидо-белковых веществ.

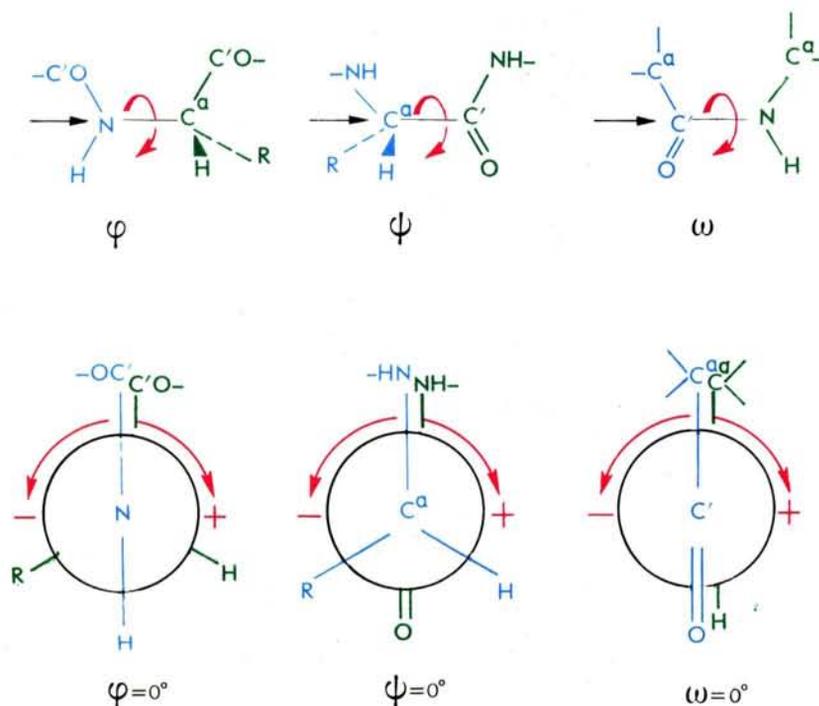
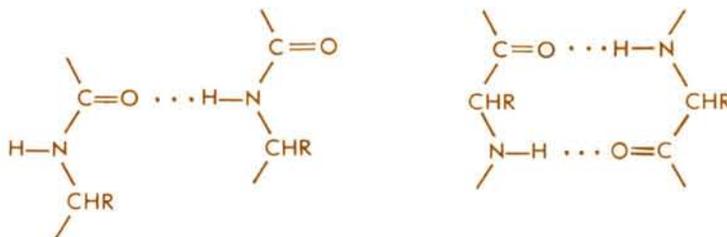


Рис. 35. Конформации пептидной цепи, отвечающие нулевым значениям углов φ, ψ и ω (черные стрелки указывают направление взгляда наблюдателя).

Невалентные взаимодействия в пептидной цепи. Пространственная структура белков и пептидов в основном определяется невалентными взаимодействиями между различными атомами. К их числу относятся ван-дер-ваальсовы, электростатические, или ионные, ион-дипольные и диполь-дипольные, гидрофобные, торсионные взаимодействия и водородные связи.



Водородные связи, как правило, образуются между подвижным атомом водорода ($-\text{OH}$, $-\text{NH}$, $-\text{SH}$) и гетероатомом, чаще всего атомом кислорода. Водородная связь имеет донорно-акцепторную природу, т. е. она образуется с участием неподеленной электронной пары гетероатома (донор электронов); акцептором является атом водорода. Наибольшее значение для формирования пространственной структуры белков имеют водородные связи между CO - и NH -группами пептидного остова.

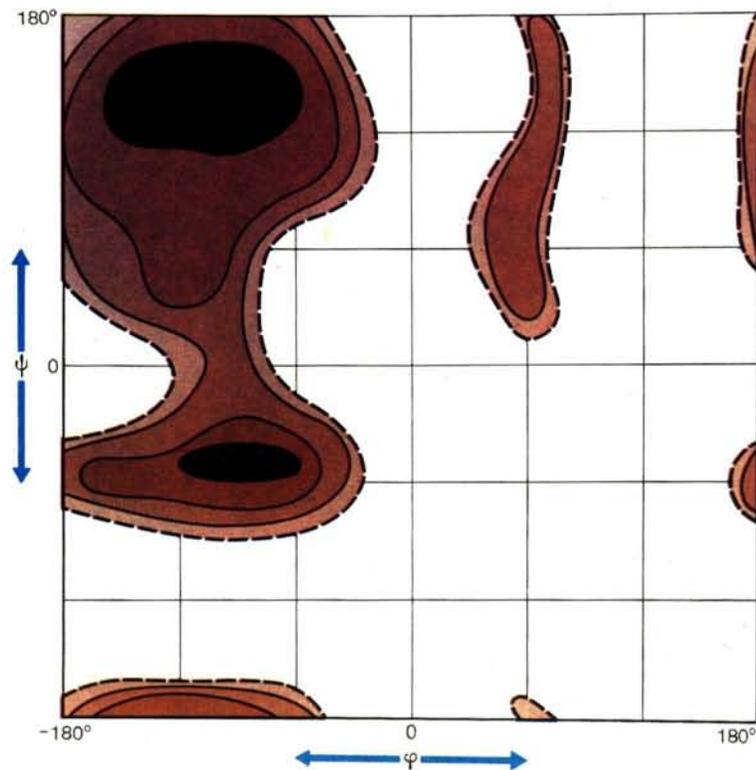
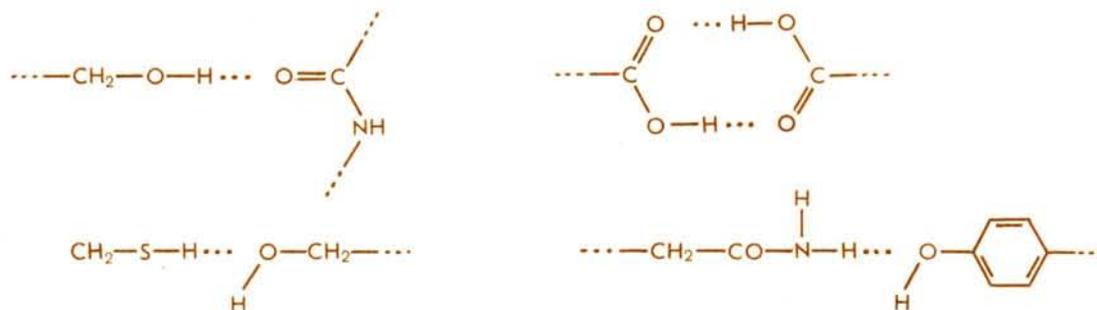


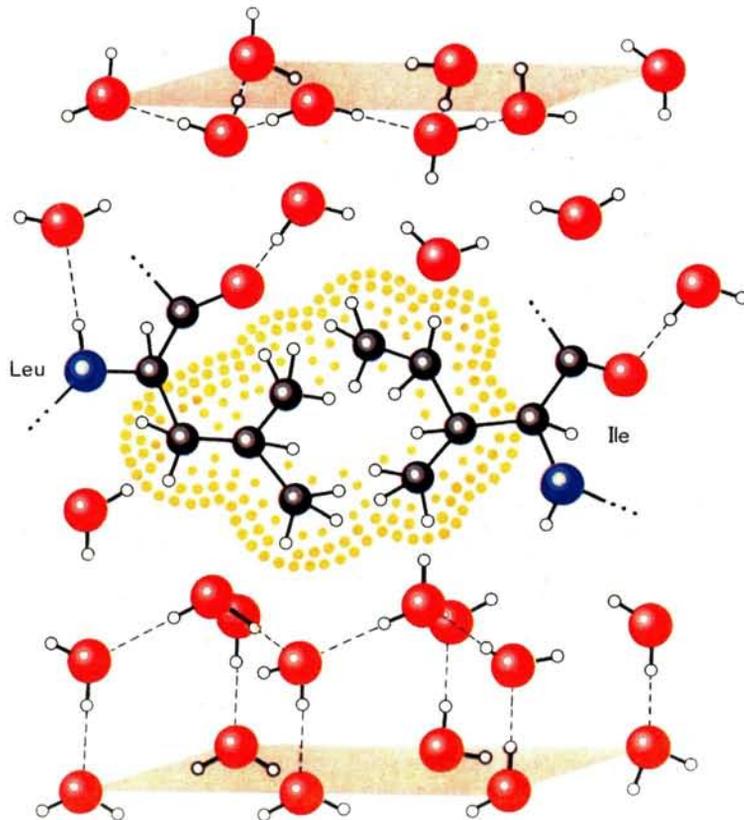
Рис. 36. Разрешенные области для двугранных углов основной цепи.

В неполярном окружении энергия водородной связи $\text{CO} \dots \text{HN}$ составляет около 16,7 кДж/моль, а повышение полярности среды снижает эту энергию.

Помимо указанных, возможны и водородные связи с участием функциональных групп боковых цепей, например:



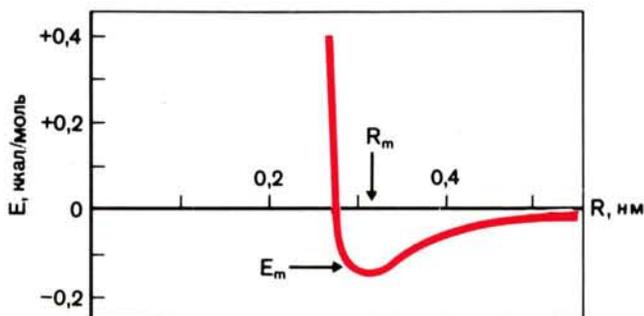
Труднее объяснить гидрофобные взаимодействия. По существу, такие взаимодействия, имеющие энтропийную природу, связаны с тем, что неполярные заместители выталкиваются из воды и стремятся ограничить свой контакт с водой; напротив, вода стремится



восстановить свое структурированное состояние и как бы принудительно группирует заместители в кластеры, обладающие минимумом энергии. В такого рода «взаимодействия» вступают в основном неполярные боковые группы аминокислотных остатков.

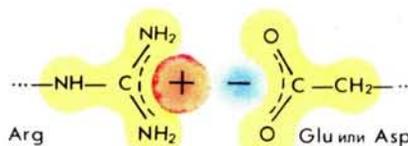
Ван-дер-ваальсовы взаимодействия, описываемые потенциалом Ленард-Джонса (рис. 37), складываются из дисперсионных сил притяжения атомов и сил взаимного отталкивания их электронных оболочек. Как видно из рисунка 37, наиболее выгодным является расстояние R_m , равное или близкое сумме эффективных радиусов взаимодействующих атомов. Энергетический вклад каждого контакта невелик ($< 0,42$ кДж/моль), но ввиду их большого числа ван-дер-ваальсовы взаимодействия дают основной вклад в суммарную энергию внутримолекулярных невалентных взаимодействий.

Рис. 37. Потенциал Ленард-Джонса (минимум потенциала отвечает расстояние R_m и энергия притяжения E_m).



Астбери [Astbury] Уильям Томас (1898—1961), английский кристаллограф. Образование получил в Кембриджском университете; работал в Университетском колледже, а затем в Королевском институте в Лондоне. Автор фундаментальных работ по изучению пространственной структуры кератина, миозина, фибрина и коллагена. Впервые обнаружил β -структуру белков.

Ионные, или электростатические, взаимодействия представляют собой взаимодействия заряженных групп. При этом, как известно, одноименно заряженные группы отталкиваются, а разноименно заряженные притягиваются. К ним относятся, в частности, взаимодействия ионогенных групп, образующих солевые связи.



Энергия солевых связей в гидрофобном окружении может достигать 41,9 кДж/моль, но их число в белках сравнительно невелико. Повышение диэлектрической постоянной среды понижает энергию солевых связей. Во многом аналогичны электростатическим ион-дипольные и диполь-дипольные взаимодействия.

Наконец, торсионные взаимодействия характеризуют «скрученность» ординарной связи. В частности, поворот какой-либо группировки вокруг ординарной связи может нарушать электронную структуру этой связи и вызывать своего рода «тормозную» реакцию. Торсионные силы относительно слабы, но при анализе поворотов вокруг связей C—C, C—N в боковых цепях аминокислотных остатков их нельзя не учитывать.

Реализуемая в данных условиях конформация белка и пептида определяется суммой всех перечисленных взаимодействий и является энергетически наиболее выгодной, что и отражается «попаданием» соответствующих углов в разрешенные области конформационных «карт Рамачандрана».

Вторичная структура белков

Регулярная структура полипептидной цепи предопределяет возможность формирования стандартных, так называемых канонических, конформаций, легко обнаруживаемых в нативной форме с помощью различных методов. Такого рода пространственно упорядоченные участки, стабилизированные водородными связями между пептидными CO- и NH-группами, называются элементами *вторичной структуры*.

Исторически первой описанной пространственной конфигурацией полипептидной цепи была β -структура, предложенная У. Астбери в 1941 г. на основании рентгеноструктурных исследований β -кератина. Через 10 лет Л. Полинг и Р. Кори установили, что β -структура, или «складчатый лист» (рис. 38), — это стабилизированный межцепочечными водородными связями ассоциат вытяну-

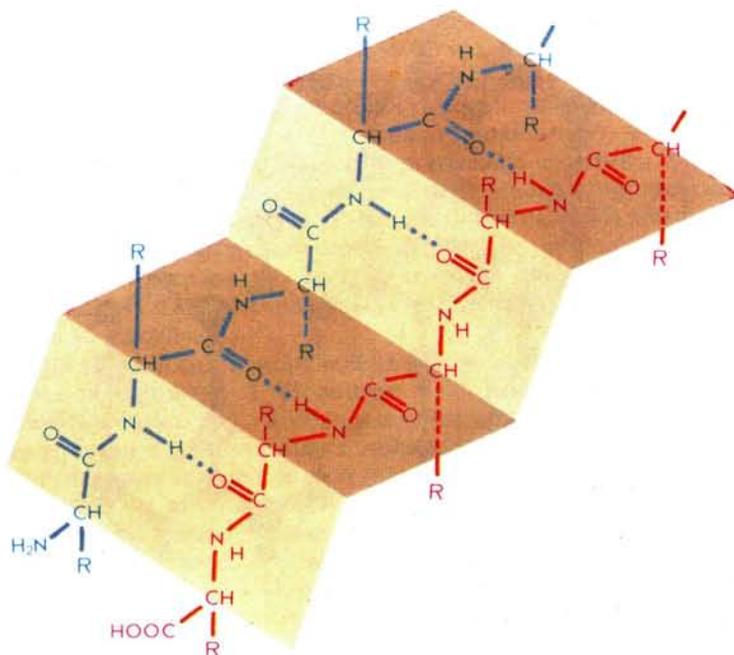
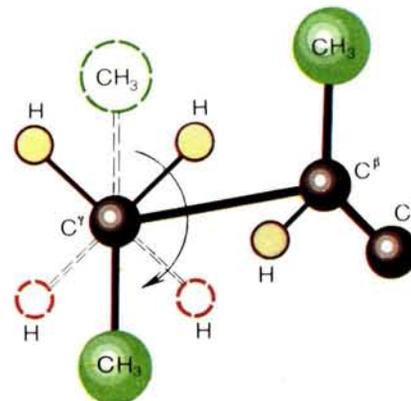


Рис. 38. Конформация β -складчатого листа.



Полинг (Pauling) Лайнус Карл (р. 1901), американский физик и химик, иностранный член АН СССР (1958). Окончил Калифорнийский технологический институт (1922). Известен фундаментальными трудами по изучению строения сложных молекул, главным образом белков. Исследуя природу химической связи, создал метод электронных пар и теорию резонанса. Сформулировал (1951, совместно с Р. Кори) теорию вторичной структуры белка и открыл α -спираль. Лауреат Нобелевской премии по химии (1954) и Нобелевской премии мира (1962), Международной Ленинской премии «За укрепление мира между народами» (1970).

тых, зигзагообразных пептидных цепей. В зависимости от взаимной ориентации цепей различают параллельные и антипараллельные β -структуры (рис. 39).

Примером белков природного происхождения с β -структурой является фиброин шелка. По существу, предельная вытянутость β -структуры и определяет большую прочность шелковой нити, ее малую растяжимость. С другой стороны, так как отдельные «слои» ее связаны друг с другом лишь за счет ван-дер-ваальсовых взаимодействий, шелк чрезвычайно эластичен.

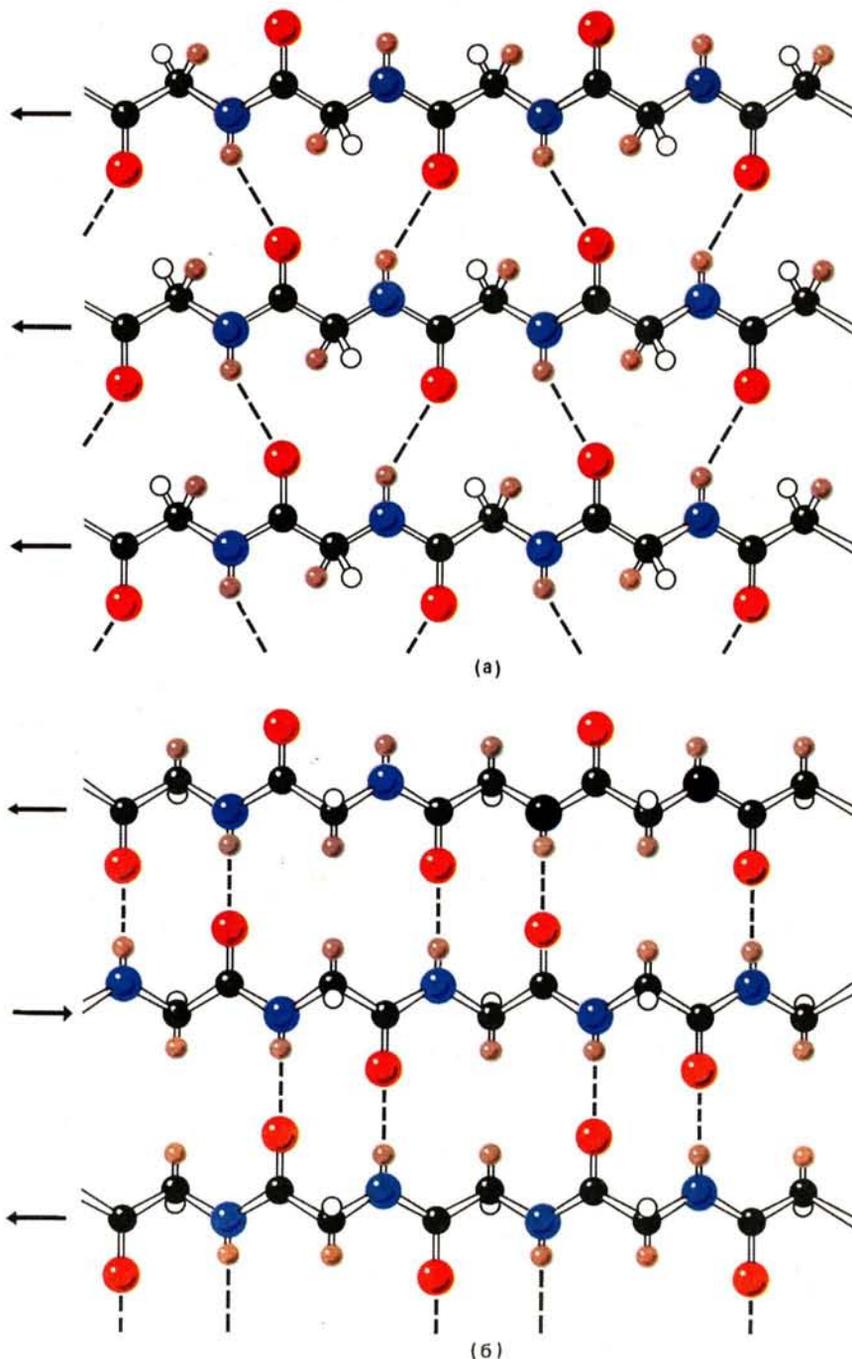


Рис. 39. Параллельная (а) и антипараллельная (б) β -структура.

В фиброине шелка полипептидные цепи расположены антипараллельно, а в β -кератине стягиваются дополнительно липопротеином серицином. Достаточно протяженные участки фиброина шелка имеют повторяющийся структурный фрагмент —Gly—Ala—Gly—Ser—Gly—Ala—, и так как остатки Ala и Ser оказываются расположенными по одну сторону средней плоскости «листа», а остатки Gly — по другую, то расстояние между слоями не одинаково и составляет 0,35 нм и 0,57 нм соответственно (а не 0,47 нм, как в канонической β -структуре). β -Структура (типа β -кератина) присутствует в синтетических полипептидах. Приблизительно 15% аминокислотных остатков глобулярных белков также входит в состав β -структур.

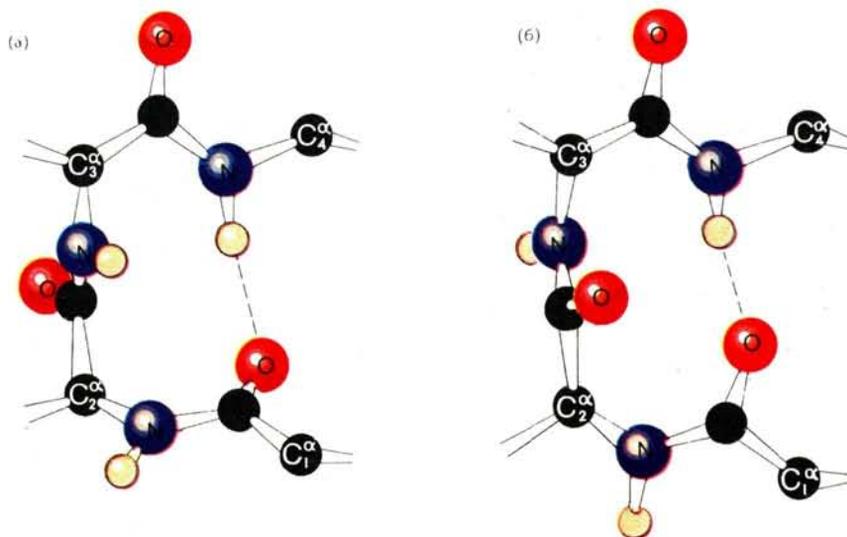


Рис. 40. Конформация β -изгибов типа I (а) и II (б).

Края антипараллельных β -структур образованы особым видом вторичной структуры, который называется β -изгибом (реверсивным поворотом). β -Изгибы образуются четырьмя последовательно расположенными аминокислотными остатками, как правило, образующими водородную связь $4 \rightarrow 1$. Анализ показывает, что возможны два основных вида β -изгибов (так называемые изгибы типа I и II, рис. 40), отличающихся ориентацией пептидного карбонила по отношению к средней плоскости 10-членного цикла. β -Изгибы — характерный элемент пространственной структуры природных и синтетических олигопептидов, как линейных, так и циклических. Фрагмент β -структуры из двух антипараллельных цепей с β -изгибом часто называют « β -шпилькой».

Одна из главных канонических форм полипептидной цепи была впервые обнаружена Л. Полингом и Р. Кори в 1951 г. и названа α -спиралью (рис. 41). В общем случае спиральная структура возникает, когда во всех звеньях полипептидной цепи углы поворота вокруг простых связей имеют одинаковые величину и знак, что и приводит к постепенному закручиванию цепочки. Структура α -спирали, помимо невалентных взаимодействий ближайших атомов, стабилизируется также внутримолекулярными водородными связями между C=O- и N—H-группами полипептидного остова. Радикалы аминокислотных остатков оказываются на периферии образованного спиралью цилиндра и могут, в зависимости от харак-

тера аминокислотных остатков, обеспечивать гидрофобную или гидрофильную природу этой цилиндрической поверхности. α -Спираль имеет следующие геометрические параметры: радиус $r = 0,23\text{нм}$, высота спирали (смещение) на один остаток $d = 0,15\text{нм}$; шаг α -спирали (период идентичности) $P = 0,54\text{нм}$ (рис. 42). Один виток α -спирали образуют 3,6 аминокислотных остатка. Как и любая другая спираль, α -спираль может быть правой или левой. В белках встречаются только правые α -спирали.

Рис. 41. Модель α -спиральной конформации полипептидной цепи.

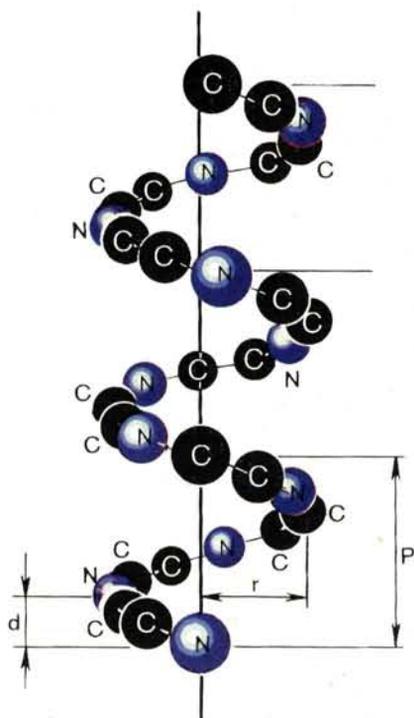
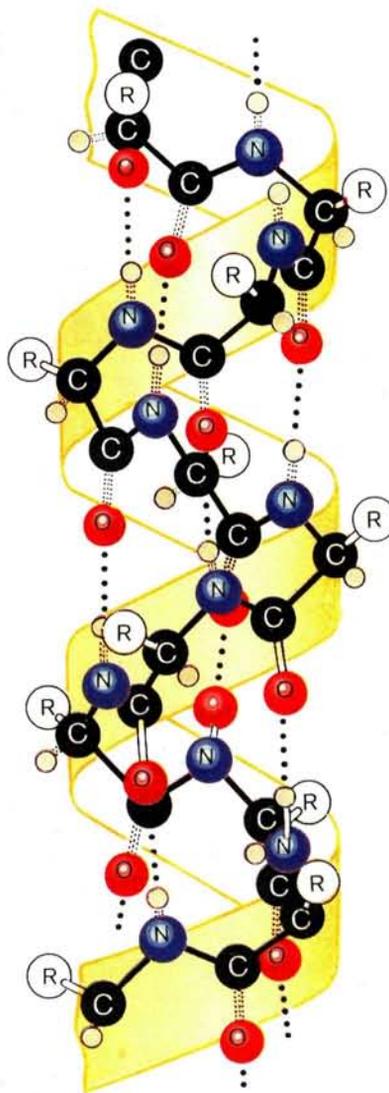


Рис. 42. Параметры спиральной конформации пептидной цепи.



Наряду с α -спиралью возможно существование и других спиралей, имеющих иные параметры, — содержащих меньшее (например, так называемая 3_{10} -спираль) или большее (π -спираль) число остатков на виток (рис. 43).

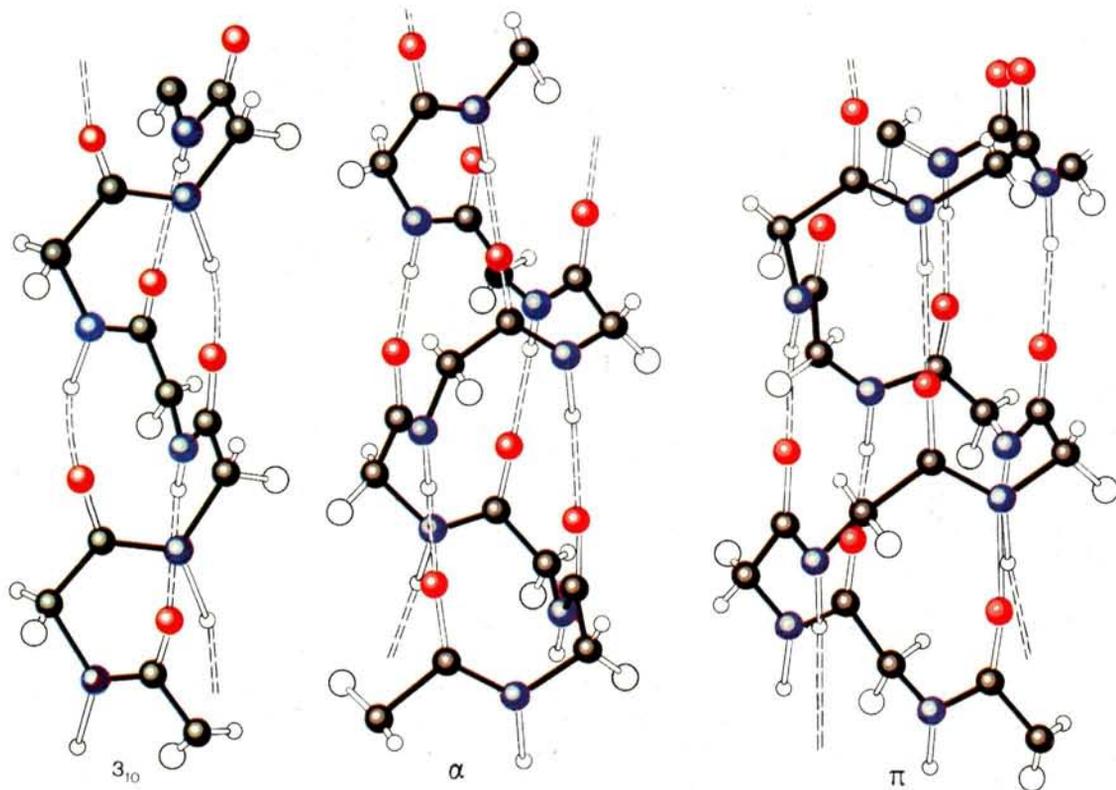
В α -спирали каждая NH-группа полипептидного остова соединяется водородной связью с группой CO четвертого от нее аминокислотного остатка ($5 \rightarrow 1$ связь), образуя 13-членный цикл. Так как в один виток α -спирали входит 3,6 остатка, то ее можно обозначить как $3,6_{13}$ -спираль. Аналогичным образом, с учетом размеров H-связанных циклов, обозначаются и другие теоретически возможные типы спиралей (рис. 44).

Спираль $2,2_7$ (2,2 остатка на виток, семичленный H-связанный цикл) оказывается весьма напряженной и в природных полипептидах и белках не реализуется. Спираль 3_{10} , хотя и является напряженной, тем не менее существует в природе, в частности найдена в миоглобине и лизоциме. Спирали $4,4_{16}$, или π -спирали, в белках практически не встречаются. В силу ограничений, вносимых структурой пролина (фиксированный угол φ), полипролин может существовать в специфических спиральных конформациях, обозначаемых как спираль полипролина I и спираль полипролина II (рис. 45). Такие спирали во многом подобны спирали коллагена. Параметры спиральных структур (рис. 42) приведены в таблице 4.

α -Спираль встречается в белках очень часто. Например, α -кератин является полностью α -спиральным белком, в миоглобине и гемоглобине содержание α -спирали составляет 75%, а в сывороточном альбумине — 50%. С другой стороны, имеются белки, в которых α -спиральные участки отсутствуют (например, нейротоксины змей, см. с. 280) или их содержание невелико. Так, в ферментах рибонуклеазе А и химотрипсине доля α -спиралей составляет 17 и 8% соответственно.

Завершая обсуждение вторичной структуры белков, следует отметить, что распространенность α -спирали и β -структуры связана

Рис. 43. Спиральные конформации полипептидных цепей с внутримолекулярными водородными связями.



с тем, что они являются энергетически предпочтительными конфигурациями полипептидной цепи. Это легко видеть и на конформационной карте (рис. 46), где для сравнения приведены параметры других регулярных форм.

Сверхвторичная структура. Следующий за вторичной структурой уровень организации полипептидной цепи связан с наличием

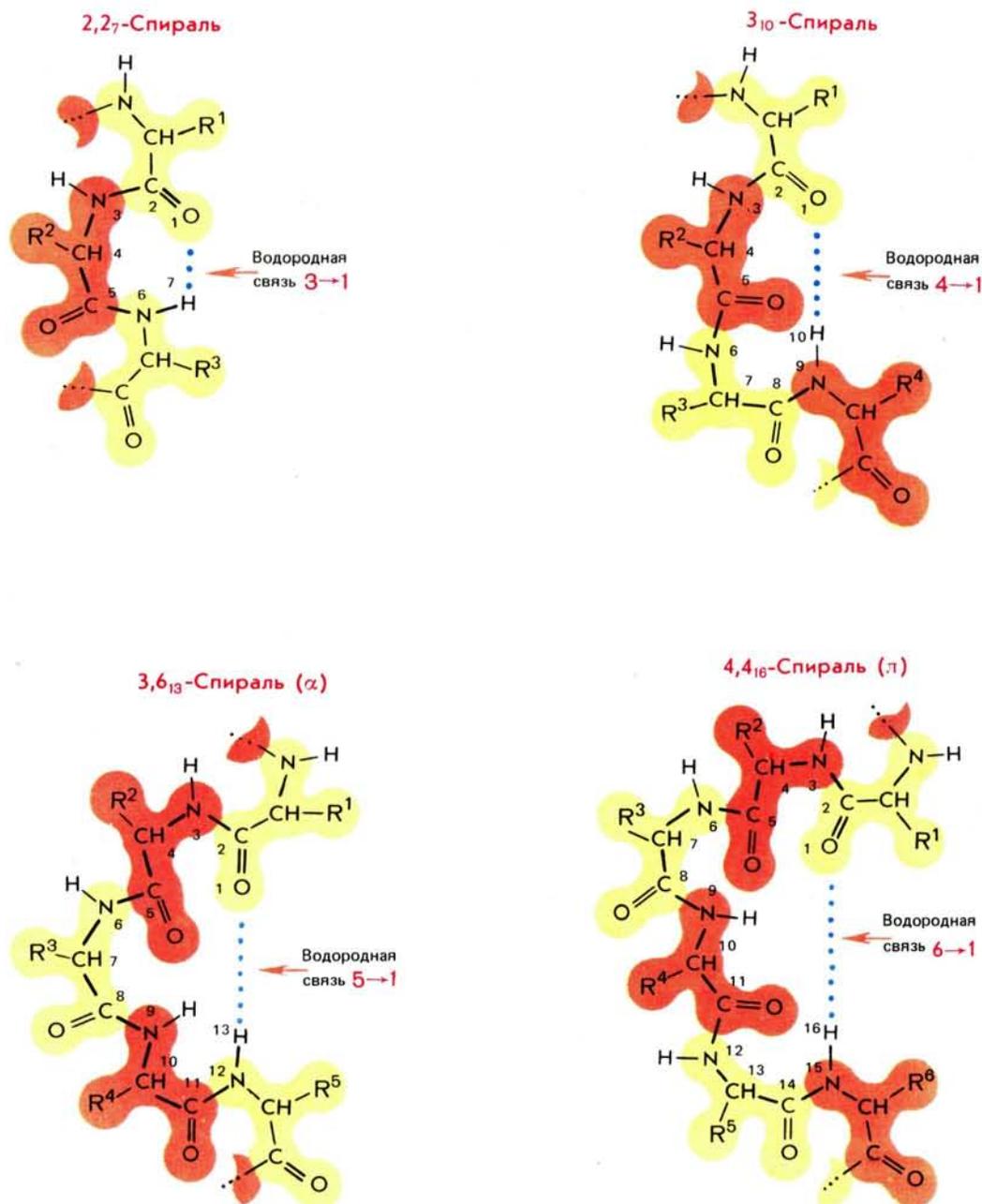


Рис. 44. Строение Н-связанных циклов в различных типах спиралей.

Параметры спиральных структур

Параметр спирали	Спираль 3_{10}	α -Спираль	π -Спираль	Полипролин I	Полипролин II
Число аминокислотных остатков на виток (n)	3,0	3,6	4,4	3,3	3 (лево-вращающаяся спираль)
Высота спирали на один аминокислотный остаток d (нм)	0,2	0,15	0,11	0,19	0,31
Высота спирали на один виток (шаг спирали) P (нм)	0,6	0,54	0,5	0,57	0,93
Углы (в градусах)					
φ	-49	-47	-57	-83	-76
ψ	-26	-57	-70	+158	+146
ω	+180	+180	+180	0	+180

Строение белков и пептидов

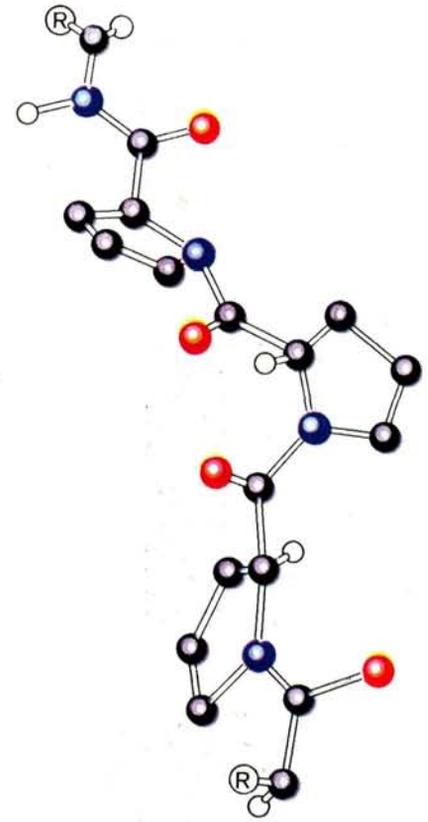


Рис. 45. Спираль полипролина II.

ансамблей взаимодействующих между собой вторичных структур. В частности, имеются примеры агрегации α -спиралей с образованием суперспирализованных систем.

Наиболее известна в этом отношении структура α -кератина шерсти. Три α -спиральные цепи кератина скручены в протофибриллы, которые, в свою очередь, объединены в микрофибриллу, обра-

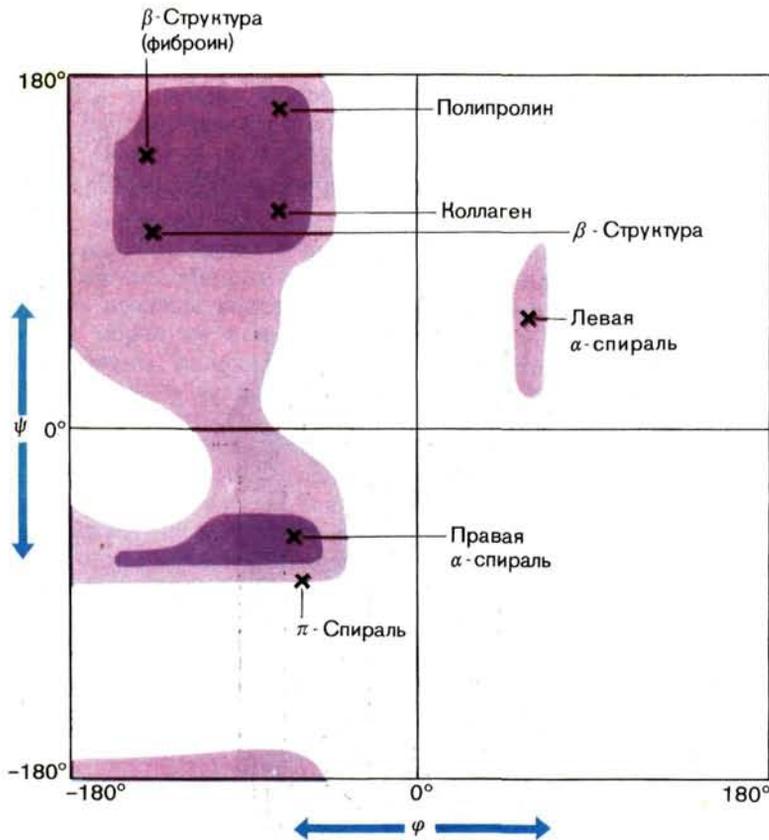


Рис. 46. Двугранные углы регулярных структур.

Рис. 47. Сборка α -кератина.

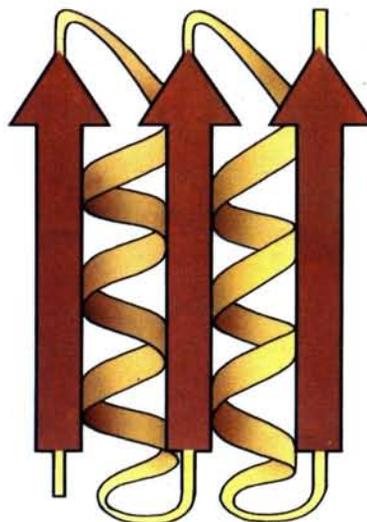
зующую волос (рис. 47). Такая сверхвторичная структура объясняет, почему шерсть эластична, легко растягивается и после снятия усилия постепенно восстанавливает свою длину. В силу того, что межмолекулярные связи слабы, шерсть непрочна. В волокнах шерсти период идентичности равен 0,51 нм (а не 0,54 нм, как в «канонической» α -спирали).

Короткие участки суперспирализованных антипараллельных α -спиралей присутствуют и в некоторых глобулярных белках. Весьма компактную левую тройную спираль образуют параллельные спирали типа полипролина в коллагене (см. с. 257). Другая распространенная группа супервторичных структур — различные варианты так называемой $\beta\alpha\beta$ -структуры, в которой α -спираль взаимодействует с β -складчатым листом. Чаще всего встречается структура $\beta\alpha\beta\alpha\beta$, показанная на рисунке 48.

Многие белки содержат относительно слабо взаимодействующие между собой участки, которые называют *доменами*. Средний размер домена обычно составляет 100 — 150 остатков, что отвечает глобуле с поперечником около 2,5 нм. Вместе с тем встречаются и значительно большие домены. Вероятнее всего, формирование пространственной структуры белка вначале происходит внутри будущих доменов, а взаимная укладка доменов, т. е. образование третичной структуры, происходит на заключительных этапах формирования глобулы.

Третичная структура белков

Полипептидная цепь, содержащая определенное число участков вторичной структуры, обычно укладывается в пространстве в относительно компактную систему, в которой элементы вторичной структуры взаимодействуют между собой и с участками неупорядоченной структуры, образуя глобулу (глобулярные белки) или достаточно вытянутое волокно (фибрилярные белки). В этих случаях

Рис. 48. Сверхвторичная $\beta\alpha\beta\alpha\beta$ -структура («греческий орнамент»).

принято говорить о формировании *третичной структуры*. Для многих белков третичная структура эквивалентна полной пространственной структуре. Каждый белок обладает своей уникальной пространственной структурой.

Главным методом, с помощью которого в настоящее время определяется третичная структура белка, является рентгеноструктурный анализ кристаллических образцов. Для рентгеноструктурного анализа необходимо получение монокристаллов белков. Проблема кристаллизации часто оказывается весьма сложной и требует не только соответствующего методического арсенала, но и высокого экспериментального искусства, а порой и просто везения. Для анализа кристаллов относительно простых соединений можно пользоваться так называемыми прямыми методами. В большинстве случаев оказывается необходимо ввести в молекулу белка тяжелый атом (например, атом ртути), причем так, чтобы пространственная структура белка существенно не искажалась — это известная проблема изоморфного замещения. Кристалл изоморфного производного белка и служит основным объектом исследования.

Рентгеноструктурный анализ сегодня является самым точным и мощным методом расшифровки пространственного строения белков (нередко разрешение достигает 0,15 — 0,2 нм). Основной вклад в разработку рентгеноструктурного анализа белков был внесен английской школой кристаллографов (Дж. Бернал, Д. Ходжкин, Дж. Кендью, М. Перутц, Д. Филлипс и др.). Этим методом к настоящему времени расшифровано строение более 200 белков. Использование новейших методических подходов, наличие современной вычислительной базы позволяет резко сокращать сроки анализа и получать исчерпывающую информацию об упаковке белковой молекулы и ее динамических характеристиках.

На рисунках 49 — 52 приведены структуры некоторых белков, детально изученных на основе рентгеноструктурного анализа. Невольно приходит мысль, что многие из этих иллюстраций могли бы заслуженно занять место в коллекциях современной абстрактной живописи.

На рисунке 49 показана молекула цитохрома *c*: *a* — обычный ход пептидной цепи, где видны отдельные атомы (Р. Дикерсон, 1975); *b* — изображение той же конформации по методу Д. Ричардсон с акцентом на участки вторичной структуры. Как видно из рисунка, цитохром *c* имеет высокий процент α -спирализованных областей. Напротив, для преальбумина (рис. 50) характерно очень высокое содержание структур типа «складчатого листа», которые образуют основное ядро белковой молекулы. Еще более выразительны конформации ферментов триозофосфатизомеразы (рис. 51 *a, б*) и лактатдегидрогеназы (рис. 52), в которых упорядоченные «сгустки» β -структур в центре молекулы обрамлены α -спиралями различной длины.

Нередко возникает вопрос — правомочно ли оперировать структурой белка в кристалле, в то время как в реальных условиях белковая молекула находится в растворе или в среде со сложным составом и именно в таких условиях выполняет свою биологическую функцию? Хотя дискуссии не прекращаются, многочисленные экспериментальные данные позволяют утвердительно ответить на этот вопрос. Во-первых, кристаллы белков весьма своеобразны по своей природе, они содержат большое количество растворителя (воды), иногда свыше 60% общей массы кристалла, и даже в кристалле молекулы белка оказываются в «плавающем» состоянии. Во многих случаях показано, что структура белка в кристалле соответствует его предпочтительной конформации, ибо межмолекулярные взаимодействия в кристаллической решетке не вносят существенных «возмущений» в структуру. Во-вторых, многие белки даже



Ходжкин (Кроуфут Ходжкин) [Crowfoot-Hodgkin] Дороти (р. 1910), английский кристаллограф, иностранный член АН СССР (1976). Окончила Оксфордский университет (1932), с 1932 г. работает в Кембриджском университете. Ей принадлежат основополагающие труды по рентгеноструктурному исследованию белков, витаминов и других биологически активных соединений. С помощью кристаллографического анализа определила пространственную структуру инсулина (1936), пеницилина (1946), витамина В₁₂ (1956). Лауреат Нобелевской премии по химии (1964).



Филлипс [Phillips] Дэвид Хилтон (р. 1924), английский биофизик и кристаллограф. Окончил Кардиффский университет (1951), с 1966 г. — профессор Оксфордского университета. Основные работы — по изучению пространственного строения белков методом рентгеноструктурного анализа. Установил структуру лизоцима и предположил механизм его действия.

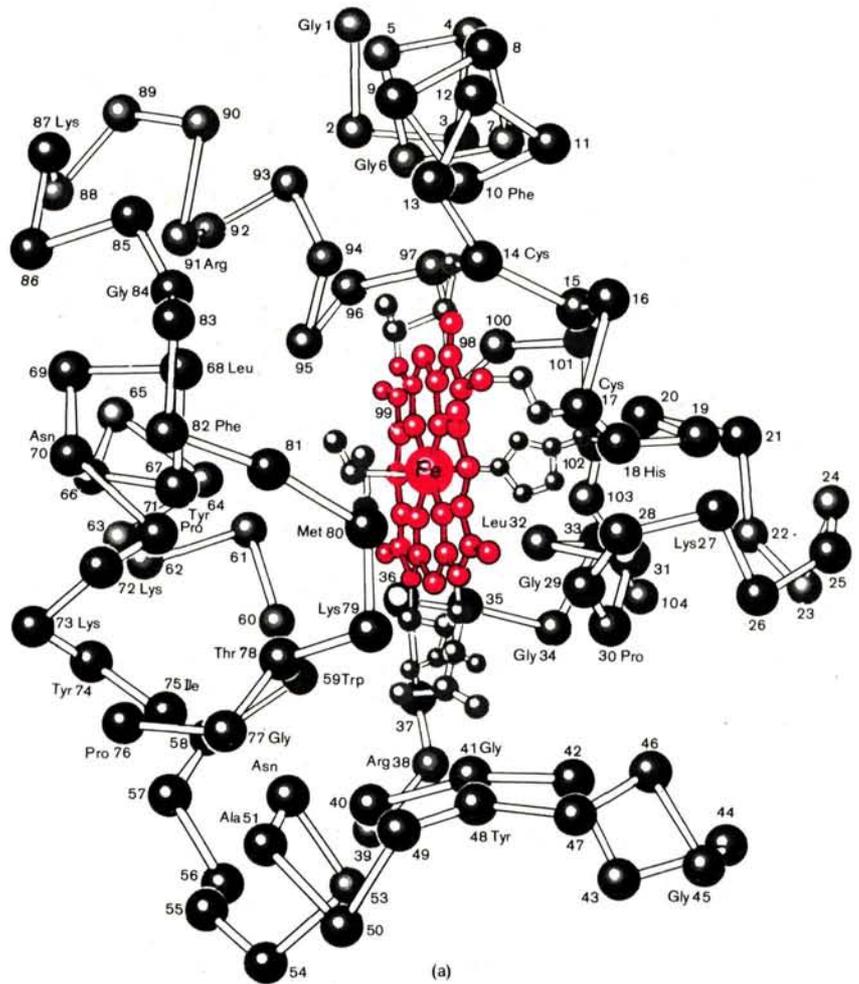


Рис. 49, а. Пространственная структура цитохрома с в кристалле; красным цветом выделен гем.

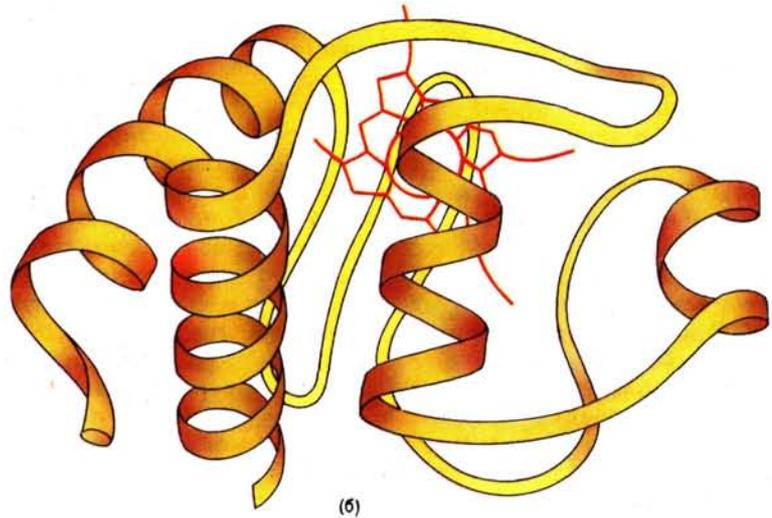


Рис. 49, б. Схематическое изображение укладки полипептидной цепи в цитохроме с.

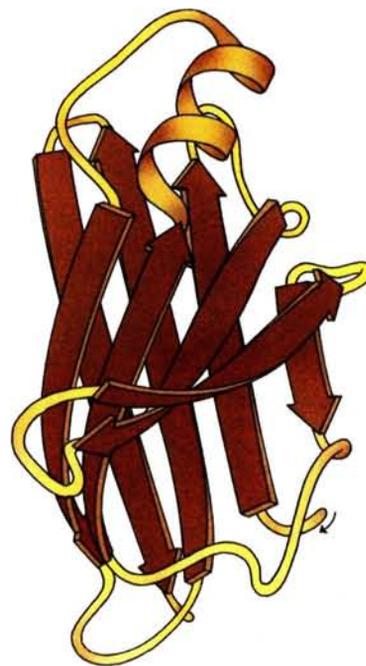
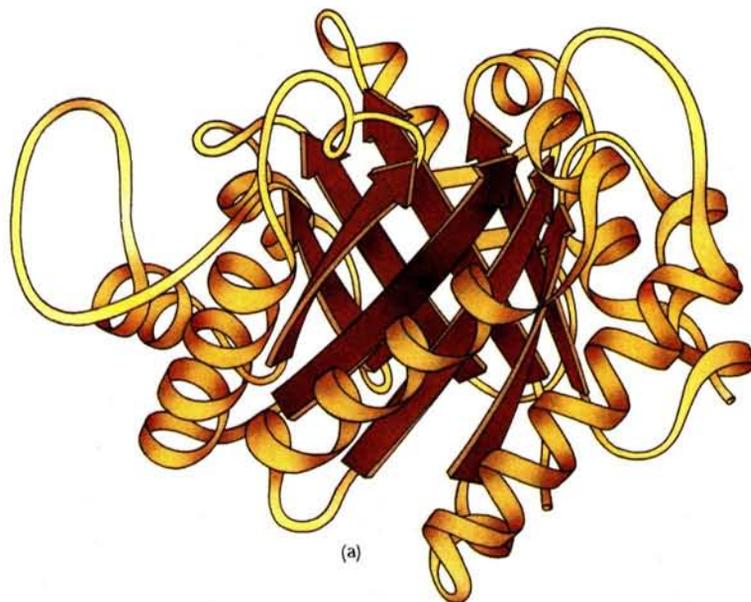


Рис. 50. Схема укладки полипептидной цепи в преальбумине.

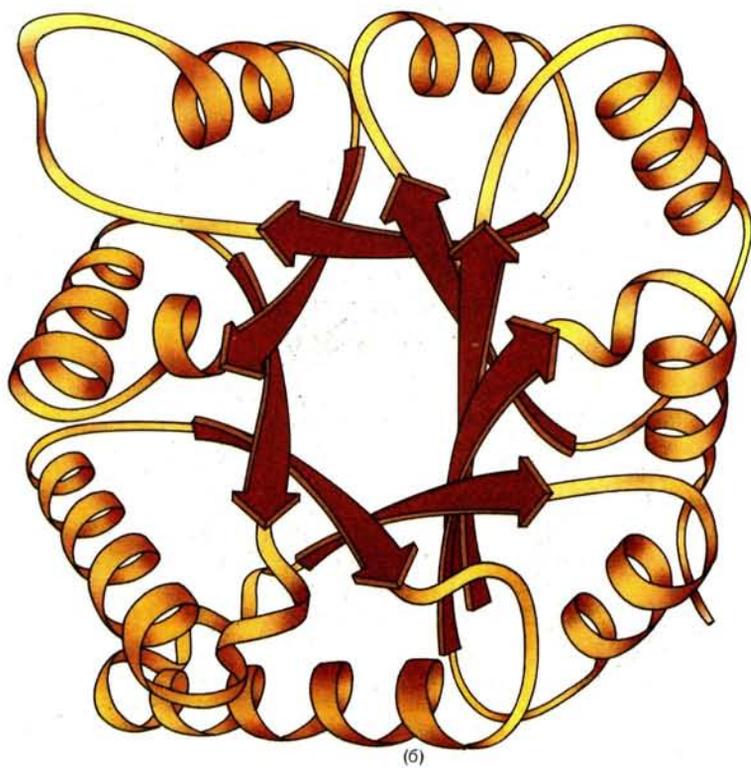


Рис. 51. Схема укладки полипептидной цепи в триозофосфатизомеразе: а — вид сбоку, б — вид сверху.



Кендрию (Kendrew) Джон Коудери (р. 1917), английский биофизик и биохимик. Окончил Кембриджский университет (1939); с 1946 г. — профессор Кембриджского университета, одновременно с 1975 г. — руководитель Европейской лаборатории молекулярной биологии в Гейдельберге. Основные работы — в области изучения строения белков. Впервые методом рентгеноструктурного анализа с применением ЭВМ определил пространственное строение молекулы миоглобина и предложил трехмерную модель его структуры (1960). Лауреат Нобелевской премии по химии (1962, совместно с М. Перутцем).

в кристалле сохраняют и проявляют биологическую активность, что подтверждается прямыми опытами с монокристаллами некоторых ферментов. Так, в ряде случаев удается внедрить непосредственно в кристалл фермента соответствующий субстрат (путем выдерживания кристалла в концентрированном растворе субстрата) и наблюдать расщепление субстрата, протекающее с достаточно высокой скоростью. Сопоставление рентгеноструктурных данных для свободных ферментов и их комплексов с ингибиторами (или псевдосубстратами) дает ценную информацию о конформационных превращениях и механизме функционирования белковых молекул (см. с. 190).

Следует отметить, что все выводы о зависимости между строением и биологической функцией многих белков, сделанные на основании рентгеноструктурных данных, до настоящего времени полностью оправдываются. Таким образом, можно утверждать, что белки, как правило, обладают достаточно устойчивой пространственной структурой, которая в кристалле или в растворе с определенными параметрами среды сохраняет свою компактность и, следовательно, «нативность» в биологическом смысле.

Своеобразная ситуация сложилась с исследованием третичной структуры мембранных белков. В силу гидрофобной природы они

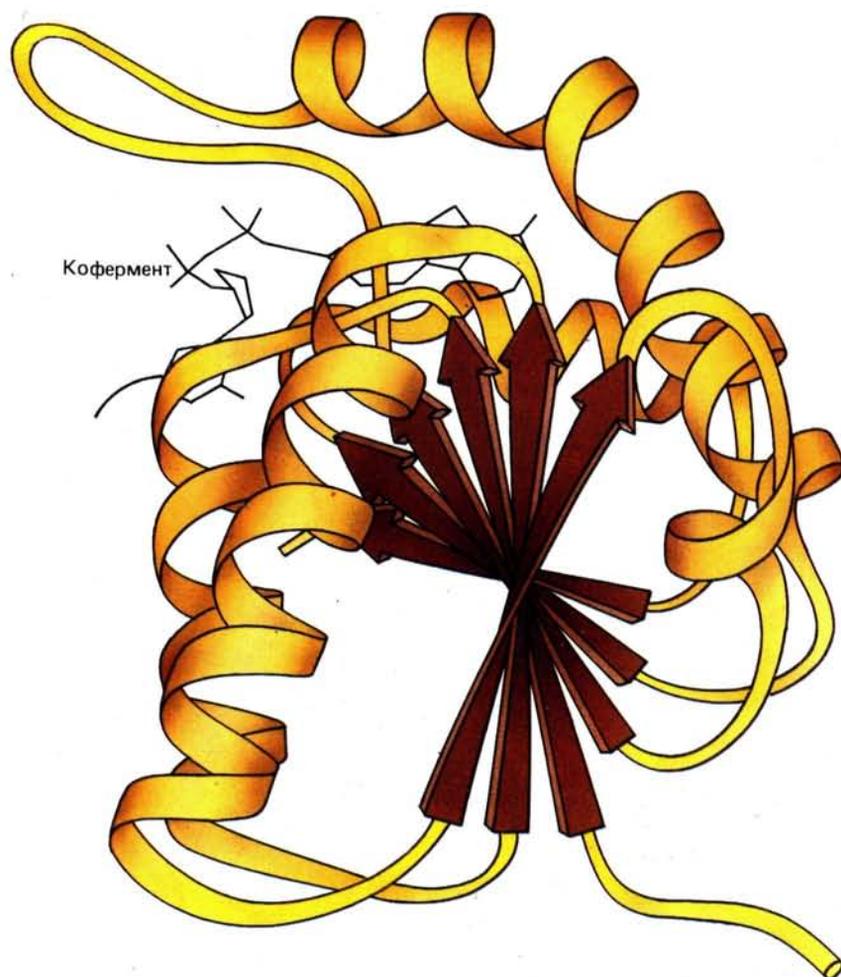


Рис. 52. Схема укладки полипептидной цепи в домене I лактатдегидрогеназы.

нерастворимы в воде, трудно поддаются выделению в индивидуальном состоянии и кристаллизации. Для определения пространственной структуры мембранных белков Р. Хендерсон предложил использовать анализ двумерных кристаллов с помощью электронной микроскопии. Двумерный кристалл — это, по существу, тонкая пленка, представляющая собой липидную мембрану с включенными в нее белками; такая пленка, получаемая с помощью особой техники, характеризуется упорядоченностью входящих в нее молекул. Получить трехмерную картину удастся в результате анализа образца при различных углах наклона по отношению к направлению пучка электронов.

Точность собираемой таким путем информации зависит прежде всего от качества кристаллов; в большинстве случаев достигается разрешение не выше 1,5 — 2 нм. Тем не менее метод позволяет делать выводы о пространственной организации молекулы, особенно для больших белков, состоящих из нескольких субъединиц. Так, например, в ходе исследования трехмерной структуры цитохром-с-редуктазы — фермента системы окислительного фосфорилирования в митохондриях — удалось установить общую форму молекулы и взаимное расположение ее субъединиц (рис. 53). Размер молекулы фермента в перпендикулярном к плоскости мембраны направлении составляет около 15 нм. Центральная часть молекулы, толщиной около 5 нм, погружена в липидный бислой и составляет около 30% всего белка. С одной стороны мембраны участок молекулы фермента (~ 50% всего белка) выступает над плоскостью бислоя на 7 нм, с противоположной стороны (~ 20% белка) — на 3 нм. Фермент присутствует в кристалле в виде димеров; наиболее сильный контакт между мономерами наблюдается в центре мембраны.

Аналогичным путем определены также структуры таких мембранных белков, как цитохромоксидаза, K^+ , Na^+ -аденозинтрифосфатаза, белок межклеточных контактов, рецептор ацетилхолина и др.

Денатурация и ренатурация белков. До настоящего времени в белковой химии сохранился термин «неупорядоченная структура» или «неупорядоченный (статистический) клубок». Так называют любые пространственные формы полипептидной цепи, которые не охватываются каноническими конформациями. Принято говорить о переходах α -спираль \rightarrow клубок, β -структура \rightarrow клубок и т. п. Такого рода рассмотрение постепенно утрачивает свое значение, ибо неупорядоченная структура, если она входит в состав биологически активного белка, должна описываться в точных терминах (углы φ , ψ , χ , координаты атомов). Однако не канонические формы труднее поддаются характеристике с помощью физико-химических методов, что, по-видимому, и обусловило появление не очень точного термина «неупорядоченная структура».

Сложный процесс наблюдается при денатурации белка: специфическая пространственная структура (четвертичная, третичная и вторичная) разрушается, и с точки зрения конформационных характеристик денатурированный белок представляет собой «полный хаос». Денатурация — это такое изменение нативной конформации белковой молекулы, которое происходит при достаточно резком изменении внешних условий и сопровождается заметным изменением физико-химических свойств белка и полной потерей биологической активности.

В большинстве случаев белки денатурируют при 50 — 60 °С, а термостабильные белки — при температурах около 100 °С. Температура, при которой 50% нативного белка подвергается денатурации, называется температурой перехода. Наглядным примером такого рода тепловой денатурации является свертывание белка при варке яиц.



Анфинсен [Anfinsen] Кристиан Бемер (р. 1916), американский химик и биохимик. Окончил Пенсильванский университет (1939), с 1963 г. — руководитель лаборатории биохимии в Национальном институте здоровья в Бетесде (близ Вашингтона). Основные работы посвящены изучению структуры и функции, а также синтезу белков. Ему принадлежат основополагающие труды по расшифровке первичной структуры рибонуклеазы, механизму ее денатурации и ренатурации. Лауреат Нобелевской премии по химии (1972, совместно с С. Муром, У. Стейном).

В некоторых случаях денатурацию вызывает весьма незначительное изменение рН среды. Одни белки стабильны при кислых значениях рН (например, пепсин), другие — при щелочных (щелочные протеиназы), третьи — при нейтральных. Часто для денатурации белков используют 8М раствор мочевины или 6М раствор гидрохлорида гуанидина.



Рис. 53. Пространственная модель димера цитохром-*c*-редуктазы в мембране.

Нередко денатурация белка проводится с помощью детергентов. Существует четыре класса детергентов. Наиболее часто используемыми анионными детергентами являются додецилсульфат натрия, холат и дезоксихолат натрия. *Анионные* детергенты действуют при значениях рН ниже изоэлектрической точки белка. *Катионные* детергенты в основном представлены алкильными производными триметиламмонийбромидов или хлоридов (например, тетрадецил-, тридецил- и додециламмонийбромиды), которые вызывают осаждение белка при щелочных значениях рН. В настоящее время часто используются *цвиттер-ионные* детергенты (цвиттергернты), позволяющие работать в широких диапазонах рН. Сравнительно недавно вошел в практику 3-(3-холамидопропил)диметиламмоний-3-пропансульфонат (ЧАПС — фирменное название по первым буквам английского названия детергента) — цвиттер-ионное производное холевой кислоты. Наконец, широко применяются *неионные* детергенты, такие, как тритон X-100, твин-20, твин-60, твин-80, эмульфоен, дигитонин, алкиловые эфиры сахарозы (например, β -октилглюкозид).

Такие реагенты, как β -меркаптоэтанол и дитиотреитол, восстанавливающие дисульфидные связи, обычно облегчают денатурацию белков. В ряде случаев денатурации могут способствовать хелатирующие агенты (например, этилендиаминтетрауксусная кислота), которые связывают двухвалентные катионы (Ca, Mg и др.),

играющие роль кофакторов ферментов. Напротив, добавление кофакторов или субстратов делает ферменты более устойчивыми к денатурации. В случае мембранных белков стабилизирующий эффект оказывает добавление липидов.

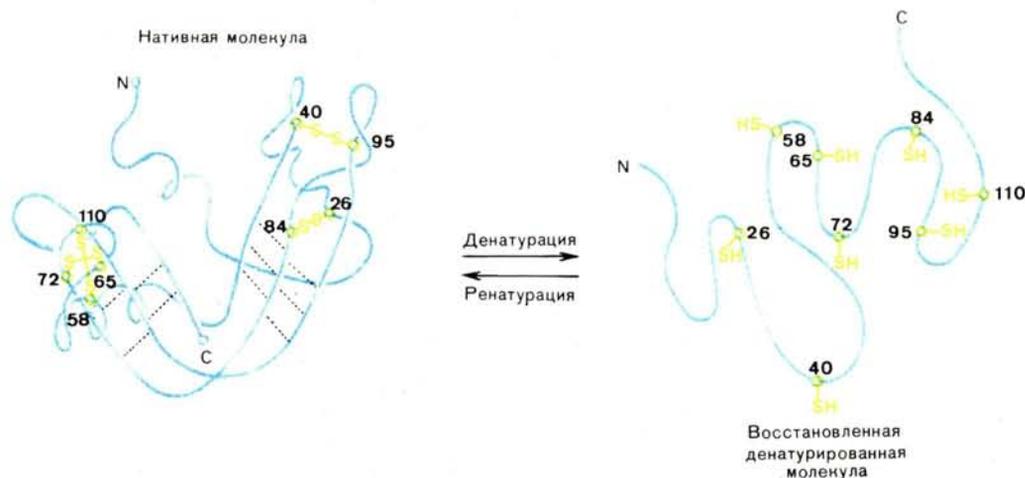
Важной является проблема обратимости денатурации, т. е. возможность вновь получить белок с исходной пространственной структурой и биологическими свойствами. Такой процесс называется ренатурацией. Впервые полную ренатурацию белка удалось осуществить на примере рибонуклеазы (К. Анфинсен, 1961).

Если полностью «развернуть» молекулу рибонуклеазы путем восстановления четырех ее дисульфидных мостиков при действии меркаптоэтанола в 8М растворе мочевины, а затем провести окисление в контролируемых условиях, то молекула вновь приобретает нативную конформацию и полностью восстанавливает ферментативную активность (рис. 54).

Эти опыты показывают, что программа «самосборки» белка закодирована в его первичной структуре. По всей вероятности, важное значение при ренатурации белка имеет образование «ядер», т. е. небольших участков упорядоченной вторичной структуры (стадия нуклеации). За этим сравнительно медленным процессом следует быстрое сворачивание цепи в нативную структуру. На первых этапах ренатурации белков, в поддержании нативной конформации которых участвуют дисульфидные мостики, образуются промежуточные производные с «правильными» и «неправильными» дисульфидными связями. В ряде случаев удавалось останавливать процесс ренатурации на определенных стадиях и выделять такие частично свернутые формы. Поскольку в целом сборка белка является достаточно быстрым процессом, можно сделать вывод о том, что природа не перебирает все возможные комбинации в очередности замыкания дисульфидных мостиков (при 4 S—S-связях их 105, а при 5 — уже 945), а сворачивание полипептидной цепи идет по ограниченному числу направлений и приводит к конформации, характеризующейся минимальной свободной энергией.

Изучение процессов денатурации и ренатурации, которое проводится с помощью разнообразных физико-химических методов (седиментация, оптические методы, метод ядерного магнитного резонанса, электрофорез, хроматография и др.), позволяет лучше

Рис. 54. Денатурация и ренатурация рибонуклеазы А.



понять конформационные особенности белков, устойчивость их пространственной структуры и природу взаимодействий, важных для стабилизации нативной конформации и проявления биологической активности.

Пространственная структура пептидов

Конформационные состояния пептидов определяются теми же силами и взаимодействиями, что и пространственная структура белков. Однако меньшие размеры молекул снижают число внутримолекулярных контактов в пептиде, что приводит к увеличению роли среды в стабилизации конформации пептида, уменьшению энергетической дифференциации форм и в целом к увеличению конформационной подвижности пептидов по сравнению с белками, фрагментами которых в ряде случаев они и являются. Этим обстоятельством можно объяснить тот факт, что для большинства природных и синтетических линейных пептидов исследования в растворах не обнаружили четко фиксированных структур. Как экспериментальные, так и расчетные данные свидетельствуют об участии в равновесии сложного ансамбля конформеров, из которых с большей или меньшей степенью надежности выявлялись характеристики отдельных форм. При этом оставался открытым вопрос о том, какая из выявленных форм отвечает «биологически активной»

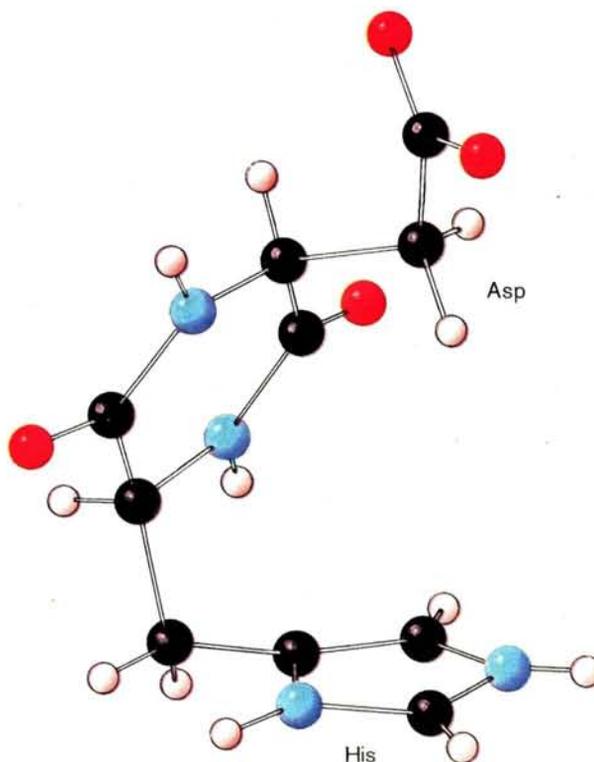


Рис. 55. Пространственная структура цикла (—His—Asp—) в кристалле.

структуре, т. е. структуре, ответственной за выполнение биологической функции.

Существенно иная ситуация сложилась при исследовании циклических пептидов. К ним относятся ряд физиологически активных пептидов, содержащих дисульфидные связи (гормоны, токсины), многие пептидные антибиотики, а также большое число модельных синтетических пептидов. На многочисленных примерах показано, что циклическая структура, существенно ограничивающая конформационную подвижность пептида, способствует формированию небольшого числа специфических конформаций.

Циклопептиды с относительно малым размером цикла (6—12 атомов) имеют весьма ограниченную подвижность циклического остова и часто содержат в своем составе *цис*-амидные связи (К. Блеха, 1967). В частности, широко распространенные циклодипептиды (например, 2,5-дикетопиперазины) (рис. 55) имеют исключительно *цис*-амидные связи (вторичные или третичные), аналогичным свойством обладают и циклотрипептиды (хотя их исследовано гораздо меньше), в циклических тетрапептидах обычно встречаются как *цис*-, так и *транс*-амидные связи. Несколько примеров приводится на рисунках 56 и 57. В циклах больших размеров *цис*-амидные связи встречаются значительно реже, притом только для третичных амидов, образованных с участием пролина, N-метиламинокислот или других N-замещенных аминокислот.

Начиная с циклических пентапептидов часто встречающимся элементом в циклических пептидах становятся β -изгибы (водородные связи типа 4 \rightarrow 1); кроме того, встречаются (хотя и реже) так называемые γ -изгибы (водородные связи типа 3 \rightarrow 1) (рис. 58).

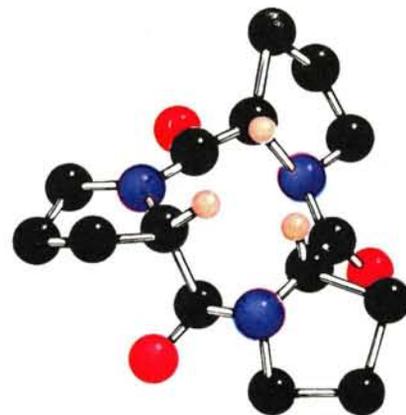


Рис. 56. Конформация цикло(-Pro)₃ в растворе и в кристалле.

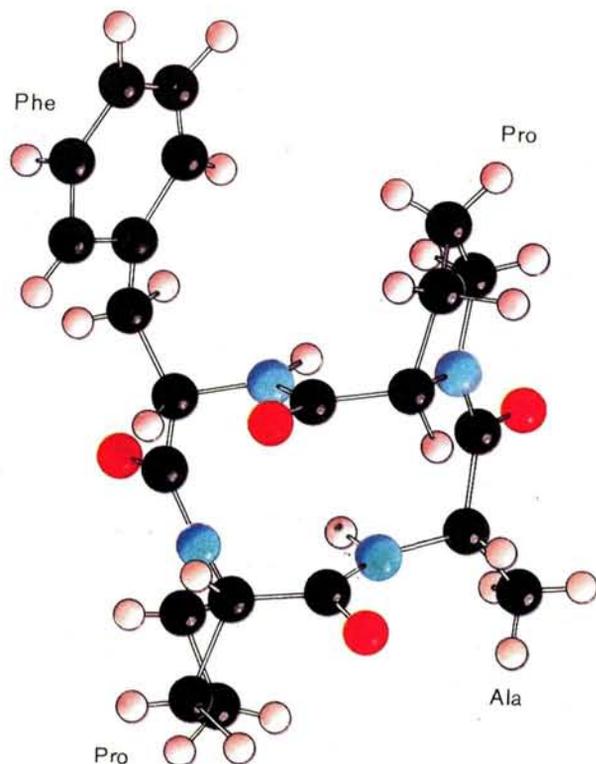


Рис. 57. Пространственная структура цикло(-Phe-Pro-Ala-Pro-).

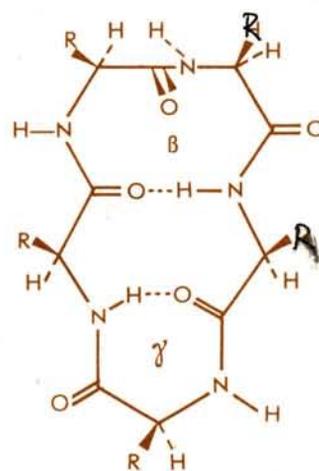


Рис. 58. Возможные типы внутримолекулярных водородных связей в циклических пентапептидах.

Обобщая теоретические представления о конформации средних циклов, И. Далэ в 1963 г. пришел к выводу, что минимальным размером пептидного цикла, в котором становится возможной реализация свободной от напряжения алмазоподобной структуры, является гексапептидный 18-членный цикл. Действительно, циклогексапептиды образуются с высокими выходами из различных исходных продуктов; описаны сотни представителей этой группы, как синтетических, так и природных.

В циклопептидах с шестью (рис. 59) и большим числом остатков возможно образование конформации складчатого листа. Наиболее яркий пример — антибиотик грамицидин S (см. с. 285). В процессе синтеза грамицидина S (Р. Швицер, 1957) была впервые обнаружена так называемая реакция удвоения, представляющая собой частный случай реакции циклоолигомеризации:

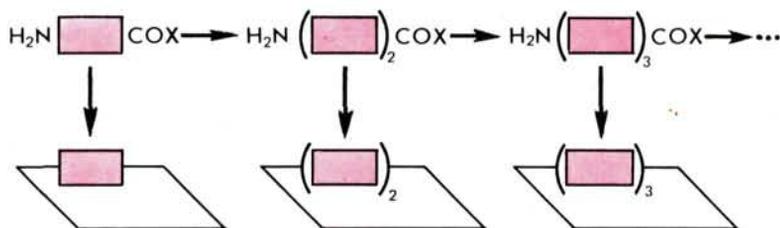
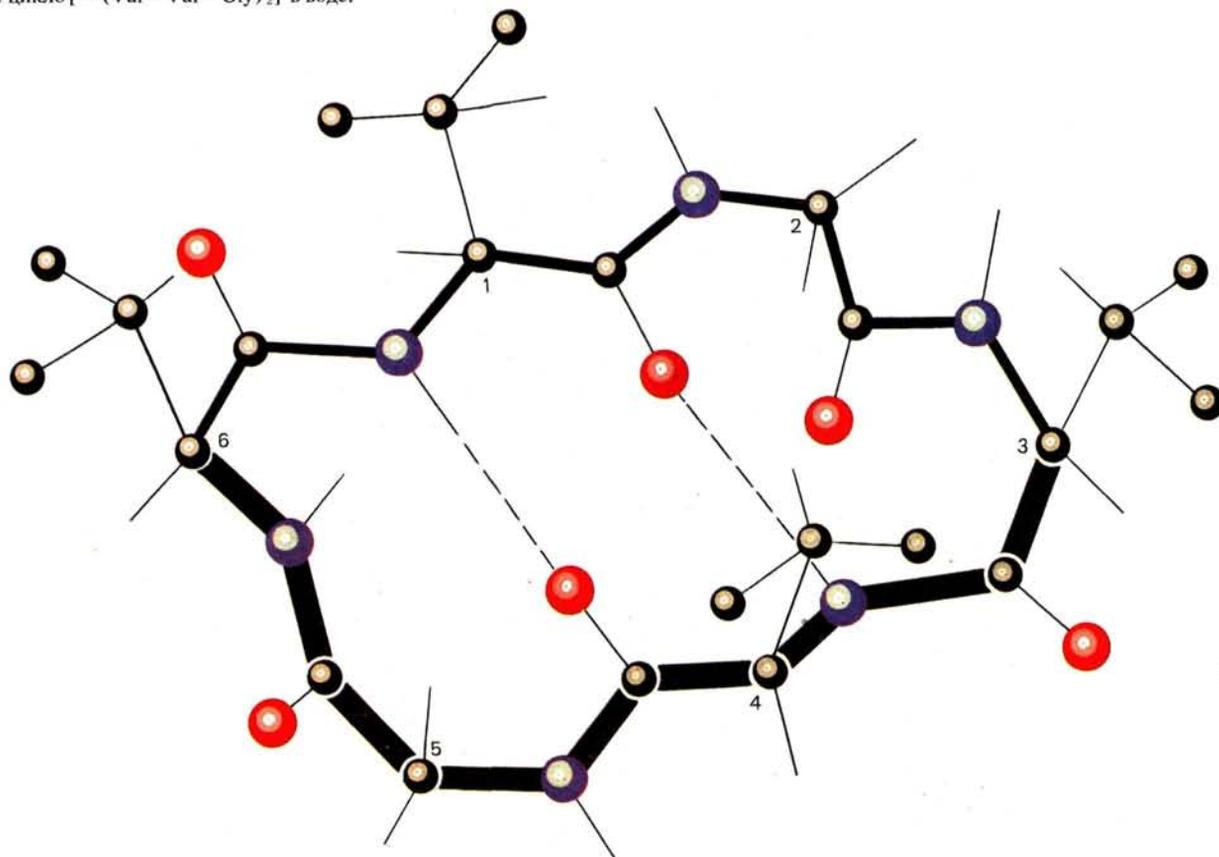


Рис. 59. Конформация складчатого листа цикло[—(Val—Val—Gly)₂] в воде.



Получение из линейного пентапептида грамицидина S, т. е. циклопептида с удвоенной длиной цепи, протекает особенно легко, что, по-видимому, объясняется конформационными факторами — образованием антипараллельных β -структурных ассоциатов (рис. 60, а, б) или β -шпилек (рис. 60, в) на стадии, предшествующей циклизации.

Аналогичные процессы наблюдаются и для линейных трипептидов, легко циклизующихся в циклогексапептиды.

Конформации циклопептидов, содержащих 15 — 20 и более атомов в цикле, хотя и ограниченные в своей подвижности, тем не менее имеют достаточно большое число степеней свободы, и обычно в равновесии находятся несколько форм близкой энергии. Наиболее устойчивы в конформационном отношении циклопептиды, имеющие добавочный ковалентный мостик, т. е. макробициклическую струк-

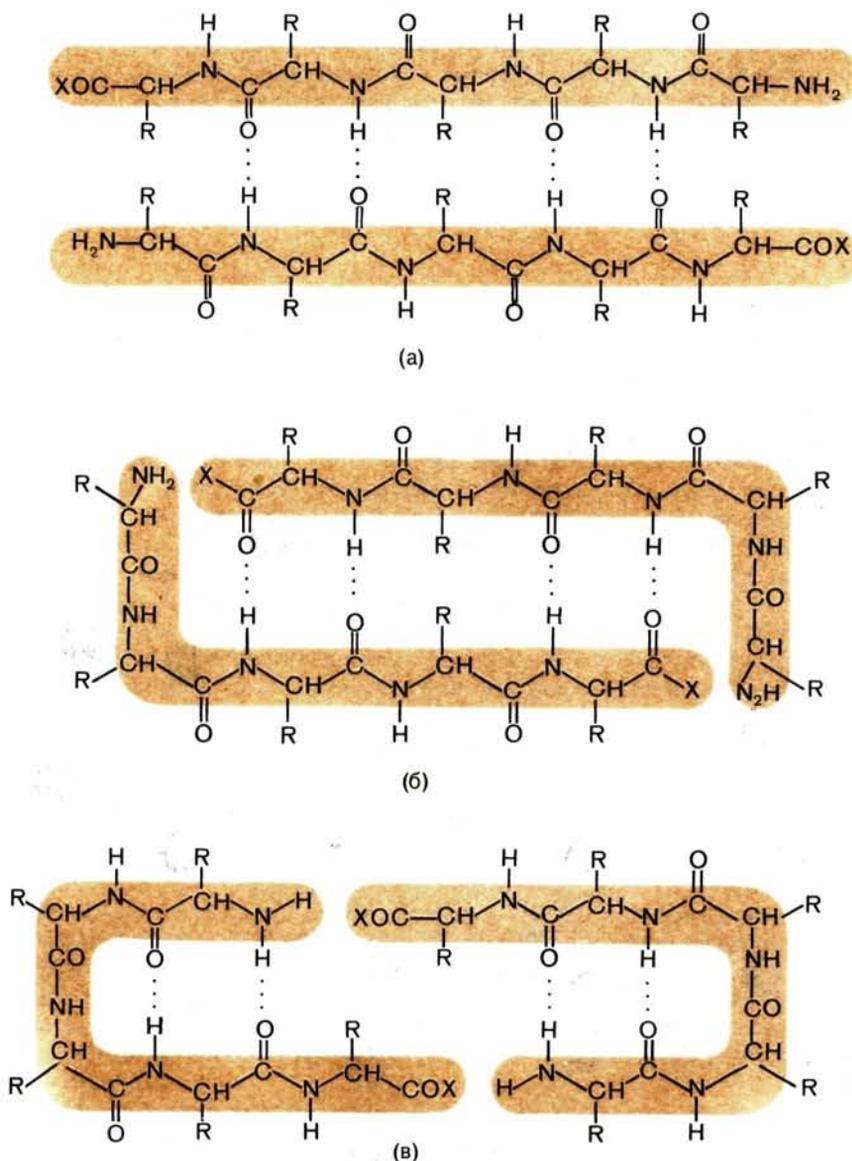


Рис. 60. Конформации линейных пентапептидов, способствующие реакции удвоения.

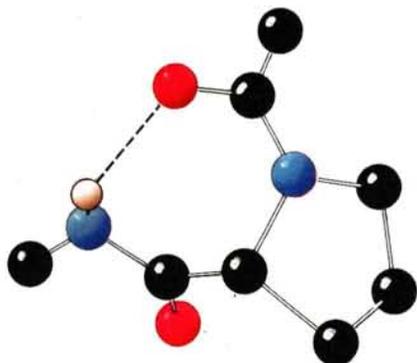


Рис. 61. Конформация метиламида ацетил-D-пролина в CCl_4 и гексане.

туру. Примером таких веществ служат аманитины — токсины бледной поганки и апамин — токсин из яда пчелы (см. с. 279).

Исследование пространственной структуры линейных пептидов в связи с уже упоминавшейся конформационной подвижностью является более сложной задачей, чем изучение циклопептидов. Простейшие модели — амиды ациламинокислот в неполярных средах (CCl_4 , гексан) образуют γ -изгибы (водородные связи $3 \rightarrow 1$) (рис. 61), удлинение цепи сопровождается появлением β -изгибов (связи $4 \rightarrow 1$) (рис. 62). Начиная с 10 — 12-членных пептидов повышается вероятность образования β -структурных ассоциатов и α -спиральных участков, однако переход к водным средам, как правило, разрушает внутримолекулярные водородные связи в коротких пептидах.

Большой интерес вызывает пространственная структура биологически активных олигопептидов. Большинство из них не образует четких пространственных форм в водном растворе. Вместе с тем в ряде случаев прослеживается присутствие свернутых форм со сближенными C- и N-концевыми участками. В неполярных средах или при взаимодействии с матрицей рецептора свернутые формы могут стабилизироваться электростатическими взаимодействиями противоположно заряженных группировок (рис. 63). Для многих биологически активных пептидов — брадикинина, тафцина, энкефалинов, пептида дельта-сна, фрагментов кортикотропина, меланотропина и др. — были получены циклические аналоги, в которых свернутые конформации фиксированы образованием ковалентных связей. Проявление этими аналогами высокой биологической актив-

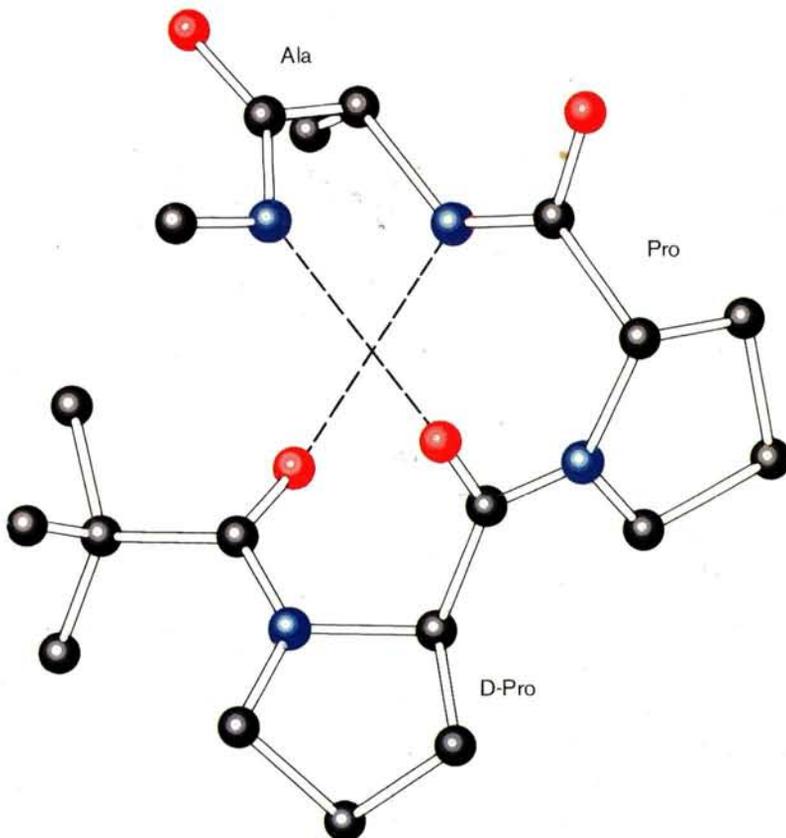


Рис. 62. Конформация $(\text{CH}_3)_3\text{C}-\text{CO}-\text{D-Pro}-\text{Pro}-\text{Ala}-\text{NHCH}_3$ в кристалле.

ности подтверждало, что именно свернутые структуры взаимодействуют с биологической мишенью. Такой подход к созданию аналогов биологически активного пептида, учитывающий стереоэлектронную структуру молекулы в целом (в противовес локальным изменениям на отдельных участках), получил название топохимического (см. с. 173).

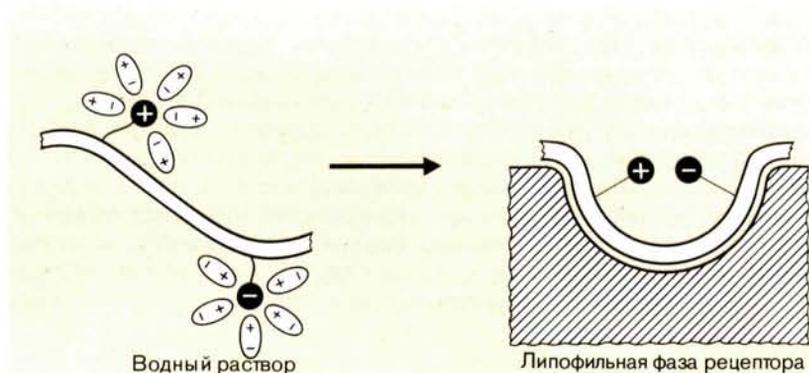


Рис. 63. Образование внутримолекулярных ионных пар при дегидратации ионогенных групп.

Методы исследования пространственного строения белков и пептидов в растворе. Конформационные состояния белков и пептидов в растворе исследуются различными методами, каждый из которых имеет свои достоинства и ограничения. Информацию о вторичной структуре можно получить из ультрафиолетовых спектров поглощения в области 180 — 210 нм: как показали исследования регулярных полипептидов (например, полилизина), α -спираль имеет меньшее (гипохромизм), а β -структура большее (гиперхромизм) поглощение, чем неупорядоченный клубок. В течение долгого времени процентное содержание α -спиральных структур оценивали по кривым дисперсии оптического вращения (уравнение Моффита, 1956). В настоящее время содержание различных типов вторичных структур определяется из спектров кругового дихроизма (КД) на основе сравнения спектров пептидов и белков с кривыми КД канонических вторичных структур, полученных для регулярных полипептидов (Э. Блоут, 1961) (рис. 64) или выведенных на основе анализа кривых КД ряда белков с установленной пространственной структурой в кристалле.

Инфракрасная спектроскопия (ИК) позволяет надежно различать *транс*- и *цис*-амидные связи в пептидах: наличие полосы при $\sim 1550 \text{ см}^{-1}$ указывает на присутствие *транс*-пептидных связей, а отсутствие полос в этой области — на *цис*-конфигурацию всех амидных связей. ИК-спектры разбавленных растворов пептидов в растворителях, не являющихся сильными акцепторами протонов (например, CCl_4 или CHCl_3), дают информацию о внутримолекулярных водородных связях: полосы при $3420 - 3480 \text{ см}^{-1}$ отвечают свободным, а полосы при $3300 - 3380 \text{ см}^{-1}$ — водородносвязанным NH-группам.

Для количественных оценок различных типов вторичных структур пользуются спектроскопией комбинационного рассеяния, срав-



Блоут (Blout) Элкан Роджерс (р. 1919), американский биохимик, иностранный член АН СССР (1976). Окончил Принстонский университет (1939), с 1962 г. — профессор Гарвардского университета, член президиума Национальной Академии наук США. Основные работы — по изучению пространственного строения полипептидов. Предложил двойную спираль для полипептидов ряда грамицидина А.



Жардецкий (Jardetzky) Олег (р. 1929), американский физикохимик. Окончил Миннесотский университет (1954); в настоящее время — профессор Стэнфордского университета (1969), директор Стэнфордской лаборатории ядерного магнитного резонанса. Известен фундаментальными трудами в области ядерного магнитного резонанса биополимеров, в частности белков.

нивая спектр образца с набором реперных спектров, характерных для определенных типов вторичных структур (рис. 65). Преимуществом спектров комбинационного рассеяния является то, что они могут быть сняты как для образцов в твердом состоянии, так и в самых разнообразных растворителях, в том числе в обычной и тяжелой воде. Этот метод дает информацию не только о вторичной структуре, но и об элементах третичной структуры: о конфигурации дисульфидных связей, участии боковых цепей остатков тирозина в водородных связях, об экспонированном (доступном для растворителя) или спрятанном в белковой глобуле положении остатков триптофана.

Микроокружение ароматических остатков в белках исследуется методом флуоресценции. Для этих целей используются также анализ спектров КД в области 250 — 300 нм и дифференциальные УФ-спектры, получаемые при изменении рН водной среды, температуры или состава растворителей. По спектрам КД следят за конформационными превращениями белков и пептидов в процессе их функционирования, а также проверяют, сохранилась ли нативная конформация при изменении условий окружающей среды или при химической модификации природного соединения. Для изучения конформации белков, содержащих парамагнитные центры — такие, как гем в гемоглобине или спиновые метки (различные группы, имеющие неспаренный электрон), введенные с помощью хими-

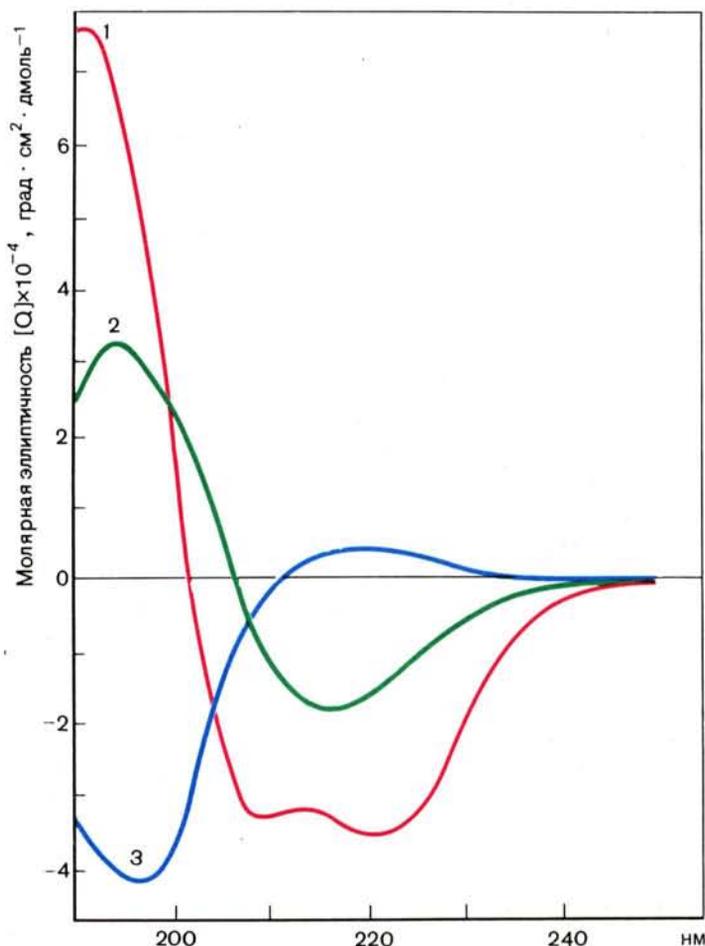


Рис. 64. Спектры КД поли-L-лизина в водных растворах в α -спиральной (1), β -структурной (2) и неупорядоченной (3) конформациях.

ческой модификации, используется метод электронного парамагнитного резонанса (ЭПР). Этим методом обычно удается определить ряд внутримолекулярных расстояний, получить сведения о форме молекулы.

Метод ядерного магнитного резонанса (ЯМР) при использовании современных подходов позволяет полностью расшифровать пространственное строение пептида или небольшого белка с молекулярной массой до 10 000 — 15 000. Конечно, необходимыми условиями являются наличие хорошей приборной базы (прибор с рабочей частотой для протонов 300 — 500 МГц), правильная стратегия исследования применительно к конкретному объекту и достаточное количество вещества (~ 1 мкмоль пептида или белка). Большой вклад в изучение пептидов и белков методом ЯМР внесли О. Жардецкий, К. Коппл и К. Вютрих.

Важнейшим этапом является отнесение сигналов в спектре ^1H -ЯМР. Сначала анализируются двумерные спектры, например COSY (корреляционная спектроскопия химических сдвигов, COSY — сокращение от английского названия), которые содержат всю информацию о спин-спиновых взаимодействиях (передаваемых через химические связи) между протонами молекулы. Эффективность такого взаимодействия протонов, характеризуемая константой спин-спинового взаимодействия, быстро падает с увеличением числа



Коппл [Corple] Кеннет (р. 1930), американский химик-биоорганик, с 1970 г. — профессор Иллинойского технологического института. Один из ведущих специалистов в области изучения конформации пептидов. Исследовал реакции переноса электронов с целью создания полимерных полупроводников.

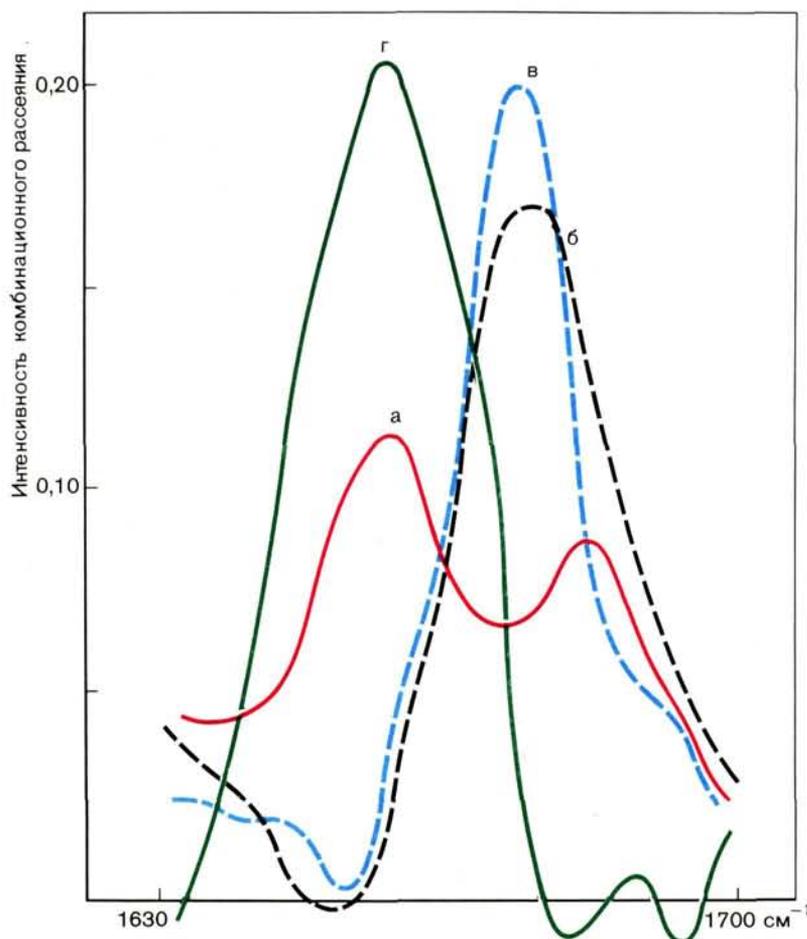
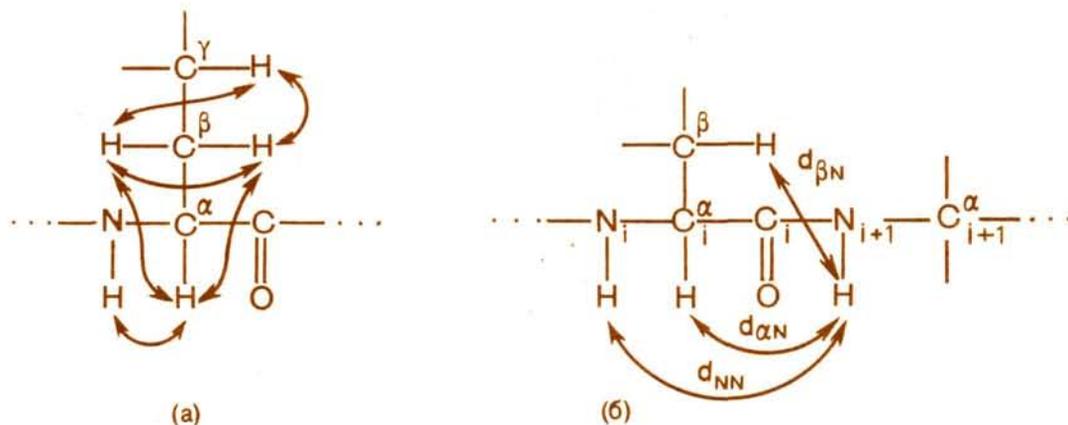


Рис. 65. Спектры комбинационного рассеяния: *a* — α -спираль, *b* — антипараллельная β -структура, *v* — параллельная β -структура, *z* — β -изгиб.



Вютрих [Wüthrich] Курт (р. 1938), швейцарский биофизик. Окончил Бернский университет, профессор биофизики Швейцарского федерального технологического института в Цюрихе. Основные научные интересы связаны с изучением пространственного строения белков и нуклеиновых кислот с применением метода ЯМР.

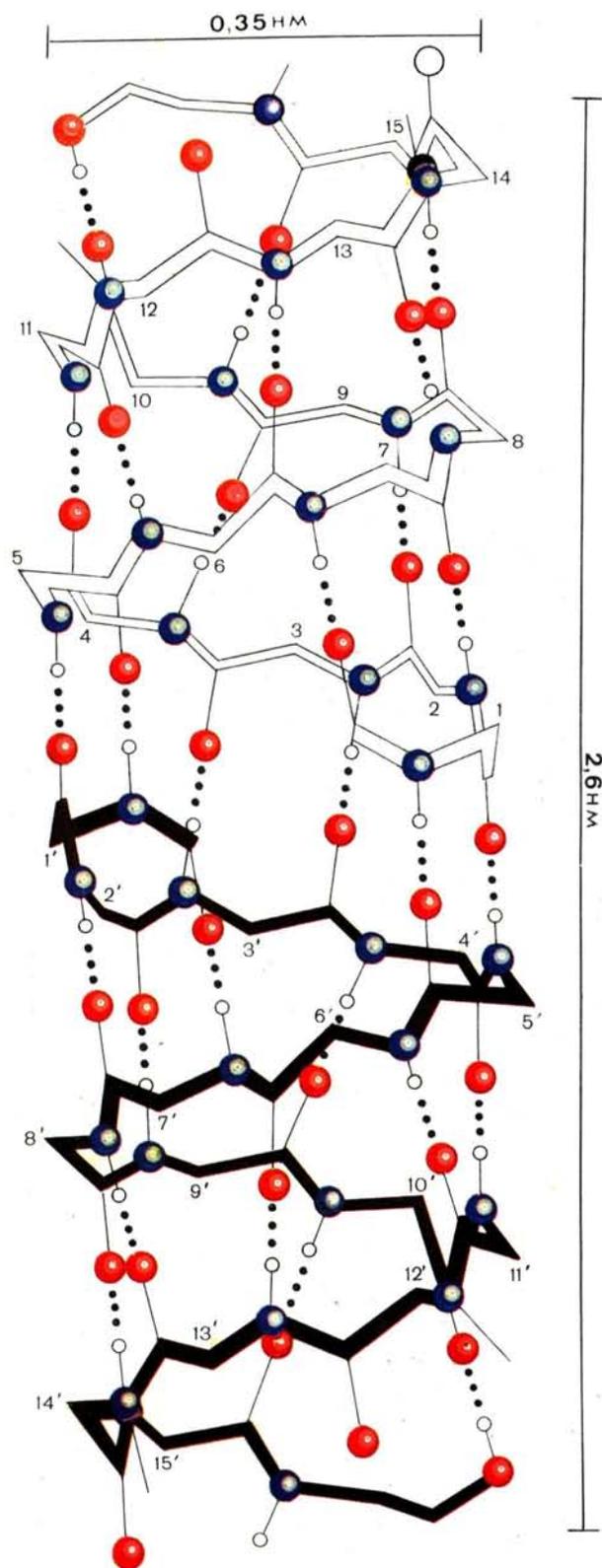
Рис. 66. Спин-спиновые взаимодействия в пептидном фрагменте, анализируемые с помощью спектров COSY (а) и NOESY (б).



разделяющих их ковалентных связей и обычно становится ненаблюдаемой уже для четырех связей. Поэтому сигналы протонов аминокислотных остатков можно классифицировать по типам спиновых систем в зависимости от числа атомов водорода при углеродных атомах C^α , C^β , C^γ и т. д. (рис. 66, а).

Затем анализируются двумерные спектры ядерного эффекта Оверхаузера (сокращенно NOESY), которые содержат всю информацию о диполь-дипольных взаимодействиях между пространственно сближенными протонами молекулы. Величина ядерного эффекта Оверхаузера обратно пропорциональна шестой степени расстояния между ядрами и для пептидов и для небольших белков становится пренебрежимо малой при расстояниях $\geq 0,4 - 0,5$ нм. Основываясь на известной аминокислотной последовательности белка или пептида, спиновые системы протонов (отнесенные к определенным типам аминокислотных остатков) «соединяют» между собой, выявляя диполь-дипольные взаимодействия между протоном NH ($i + 1$)-го остатка и протонами NH, $C^\alpha H$ и $C^\beta H$ предыдущего i -го остатка (рис. 66, б). Следуя таким образом вдоль полипептидной цепи, получают полное отнесение сигналов в спектре 1H -ЯМР к определенным остаткам аминокислотной последовательности.

Одновременно с отнесением сигналов в двумерных спектрах 1H -ЯМР получают практически всю необходимую информацию для реконструкции пространственной структуры белка в растворе. Так, константы спин-спиновых взаимодействий между протонами $H-NC^\alpha-H$ ($^3J_{HN C^\alpha H}$ характеризует угол φ), $H-C^\alpha C^\beta-H$ ($^3J_{HC^\alpha C^\beta H}$ угол χ^1) (М. Карплюс, В. Ф. Быстров) и величины ядерного эффекта Оверхаузера между протонами $C^\alpha H \dots HN_{i+1}$ [$d_{\alpha N}(\psi_i)$], $C^\beta H \dots HN_{i+1}$ [$d_{\beta N}(\chi_i^1 \psi_i)$] и $N_i H \dots HN_{i+1}$ [$d_{NN}(\varphi_i, \psi_i)$] позволяют определить торсионные углы φ_i , ψ_i , χ^1 , χ^2 -го аминокислотного остатка. Анализ ядерного эффекта Оверхаузера между протонами удаленных по аминокислотной последовательности остатков дает возможность выявить элементы вторичной структуры белка (α -спирали, β -структуры, β -изгибы). Существенное значение имеет обнаружение внутримолекулярных водородных связей, характерных для вторичной структуры белков и пептидов. Для этого изучают скорость обмена атомов водорода группы NH с растворителем (например, дейтерообмен в растворах 2H_2O) и таким образом получают данные об их доступности внешней среде. На заключительном этапе



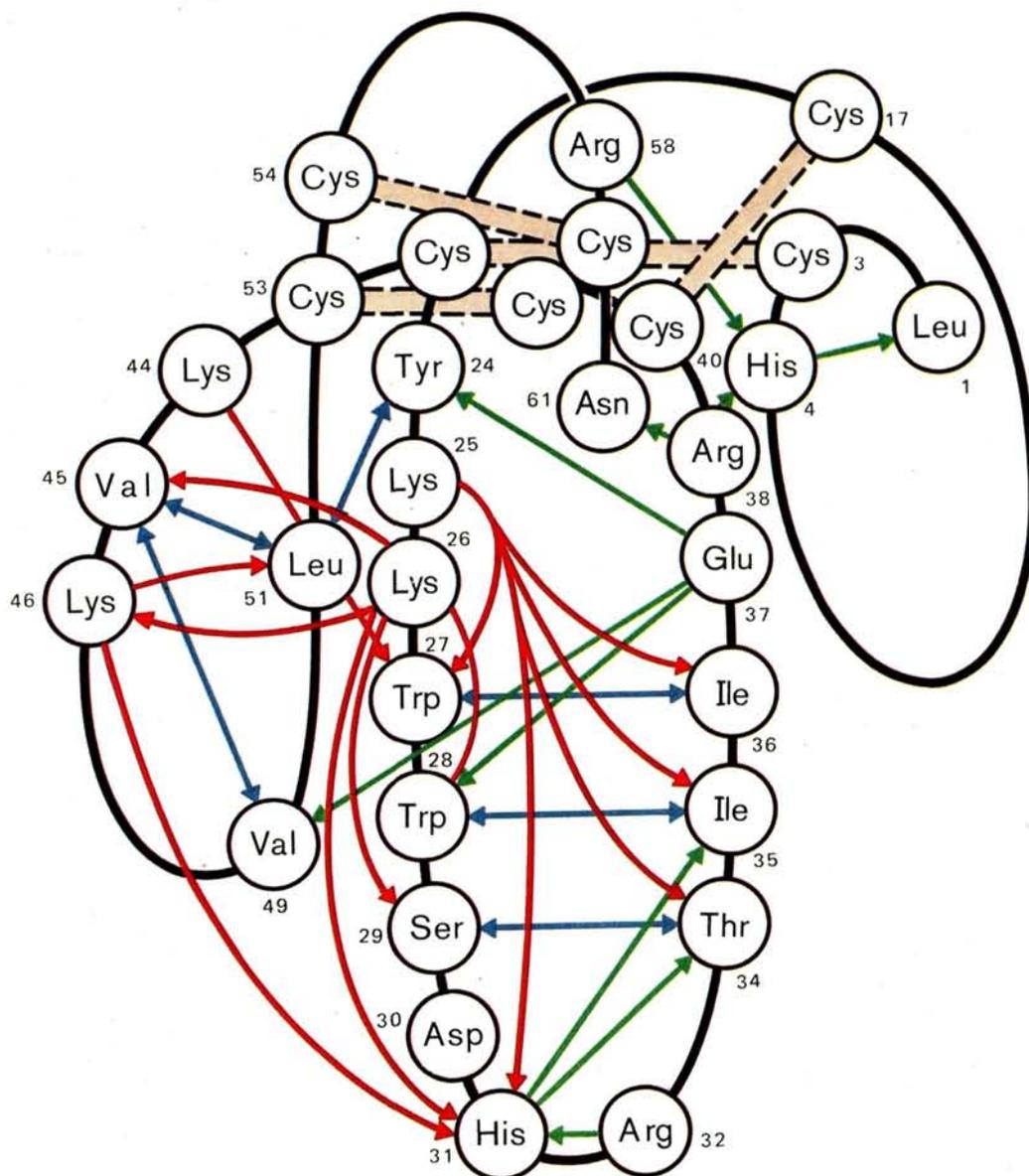
Быстров Владимир Федорович (р. 1935), советский биофизик, член-корреспондент АН СССР (1979). Окончил Московский университет (1959), с 1964 г. работает в Институте биоорганической химии им. М. М. Шенякина АН СССР. Разрабатывает общие принципы применения спектроскопии ЯМР высокого разрешения для конформационного анализа белков и пептидов в растворах. Лауреат Государственной премии СССР (1985).

Рис. 67. Пространственная структура грамицидина А в мицеллах додецилсульфата натрия.

вся совокупность полученных данных (константы спин-спинового взаимодействия, ядерный эффект Оверхаузера, доступность протонов NH внешней среде) анализируется с помощью специальных программ на ЭВМ, учитывающих длины валентных связей, валентные углы, ван-дер-ваальсовы радиусы атомов и т. д. Как правило, при этом удается достаточно точно выяснить конформацию основной полипептидной цепи и наиболее вероятную ориентацию боковых радикалов.

Особую ценность представляет информация, получаемая с помощью спектроскопии ЯМР, о динамических характеристиках пространственной структуры молекулы, ее изменениях в результате изменения среды (рН, температура, ионная сила) или взаимодействия с другими молекулами.

Рис. 68. Схема укладки полипептидной цепи нейротоксина II *Naja naja oxiana* в растворе.



Для грамицидина А, представляющего собой линейный пентадекапептид, путем анализа двумерных спектров ^1H -ЯМР была установлена пространственная структура (рис. 67) в мицеллах додецилсульфата натрия. Такие мицеллы хорошо моделируют свойства липидного бислоя мембраны, в которых грамицидин А образует трансмембранный ионный канал. Канал построен из двух правых одиночных спиралей ($\pi_{LD}^{6,3}$ -спираль), ассоциированных по типу N-конец к N-концу («голова к голове»), имеет длину $\sim 2,6$ нм и внутреннюю полость диаметром около 0,35 нм.

В качестве примера комплексного использования различных методов рассмотрено определение конформации «короткого» белкового нейротоксина II (61 аминокислотный остаток) из яда среднеазиатской кобры.

Спектры КД показали, что нейротоксин II сохраняет свою конформацию в широком диапазоне температур, pH, а также при химической модификации ряда аминокислотных остатков. С помощью лазерных спектров комбинационного рассеяния было установлено, что нейротоксин II не имеет α -спиральных участков, а содержание β -структуры составляет 30%.

Параллельное изучение методом флуоресценции природного нейротоксина и его химически модифицированных производных, содержащих дансильные и спиновые метки, позволило охарактеризовать микроокружение остатков триптофана и введенных меток и определить ряд внутримолекулярных расстояний.

Исследования методом ЭПР дали информацию о подвижности спиновых меток, селективно введенных в различные участки молекулы. Из анализа спектров ЭПР застеклованных растворов (-196°C) производных нейротоксина, содержащих по две спиновые метки, были определены внутримолекулярные расстояния между несвязанными электронами этих меток (в частности, таким образом показана близость боковых цепей некоторых остатков, удаленных в аминокислотной последовательности).

Наиболее детальная информация о пространственной структуре нейротоксина II в растворе получена методом ^1H -ЯМР. Было проведено отнесение сигналов к типам остатков и к конкретному положению в аминокислотной последовательности. Изучение скоростей водородного обмена амидных протонов выявило наличие плотной упаковки основной полипептидной цепи нейротоксина II. Анализ зависимости положения сигналов от pH позволил определить rK практически всех ионогенных группировок и идентифицировать пространственно сближенные с ним аминокислотные остатки (рис. 68, зеленая линия). Значительное число внутримолекулярных расстояний определено с помощью ядерного эффекта Оверхаузера (рис. 68, синяя линия), а также при исследовании спектров ^1H -ЯМР производных нейротоксина, содержащих спиновые метки (оценка расстояний на основе анализа уширений, вызываемых несвязанным электроном спиновой метки (рис. 68, красная линия).

В целом сумма полученных данных позволила установить конформацию нейротоксина II в растворе (рис. 68), которая близка кристаллической структуре родственного вещества — эрабутоксина *b* из яда морской змеи.



Бернал [Bernal] Джон Десмонд (1901—1971), английский физик, кристаллограф, иностранный член АН СССР (1958). Окончил Кембриджский университет (1922), с 1937 г. — профессор Лондонского университета. Ему принадлежат основополагающие труды по рентгеноструктурному анализу вирусов, белков, гормонов. Лауреат Международной Ленинской премии «За укрепление мира между народами» (1953).

Четвертичная структура белков

Многие белки состоят из субъединиц, одинаковых или различных, образующих трехмерные ассоциаты или более сложные ансамбли. В этом случае принято говорить о *четвертичной структуре* белков. Специфичность четвертичной структуры данного белка обуславливается выполняемой им биологической функцией, а взаимодействие субъединиц обеспечивает дополнительный механизм ее регуляции.

Термин «четвертичная структура» был предложен в 1958 г. английским кристаллографом Дж. Берналом как необходимое дополнение к принятому понятию о первичной, вторичной и третичной структурах белка (К. У. Линдерстрём-Ланг, Л. Полинг, 1952). Однако субъединицы в составе белков были обнаружены с помощью седиментационного метода еще в 1926—1929 гг. Т. Сведбергом, который считал, что все белки построены из определенного числа небольших стандартных субъединиц. В 1965 г. Ж. Моно предложил понятие «протомер» для наименьшей структурной



Сведберг [Svedberg] Теодор (1884—1971), шведский физикохимик, иностранный член АН СССР (1966). Окончил Упсальский университет (1907), с 1921 г.— профессор Упсальского университета. Основные работы — в области коллоидной химии, определения размеров и форм молекул. Создал метод ультрацентрифугирования (1919) и впервые построил ультрацентрифуги для исследования высокодисперсных зольей. С помощью этого метода определил молекулярную массу гемоглобина и других белков. Лауреат Нобелевской премии по химии (1926).

единицы сложного белка, формирующей путем ассоциации с целым числом идентичных единиц (одной или несколькими субъединицами) полную четвертичную структуру белка. Например, в белке из 6 одинаковых субъединиц (α_6) протомером является мономер (α), а в белке из двух типов субъединиц ($\alpha_2\beta_2$) протомер имеет состав ($\alpha\beta$). Детальное изучение четвертичной структуры белков началось, по существу, с работ М. Перутца и Дж. Кендрию по гемоглобину (конец 50-х годов).

Первый этап исследования четвертичной структуры белка — анализ его субъединичного состава. Для этого необходимо провести диссоциацию белка на отдельные субъединицы, что обычно достигается с помощью гидрохлорида гуанидина, мочевины или додецилсульфата натрия (с добавлением меркаптоэтанола для восстановления дисульфидных связей). Во многих случаях диссоциации способствуют изменение pH среды, добавление соли, замена воды на органические растворители, а также химическая модификация белка. Субстраты, различные метаболиты и кофакторы в разных белках влияют как на ассоциацию, так и диссоциацию субъединиц. Субъединичный состав белка может быть выяснен путем сопоставления его суммарной молекулярной массы с молекулярными массами отдельных субъединиц (установленными с помощью электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия), а также с числом N- и C-концевых аминокислотных остатков. Другой метод анализа заключается в сравнении числа пептидов (N), ожидаемых на основании данных аминокислотного состава, с числом реально образующихся при том или ином специфическом гидролизе молекулы белка. Пример подобного рода анализа триптических гидролизатов субъединичных белков методом пептидных карт приведен на рисунке 69.

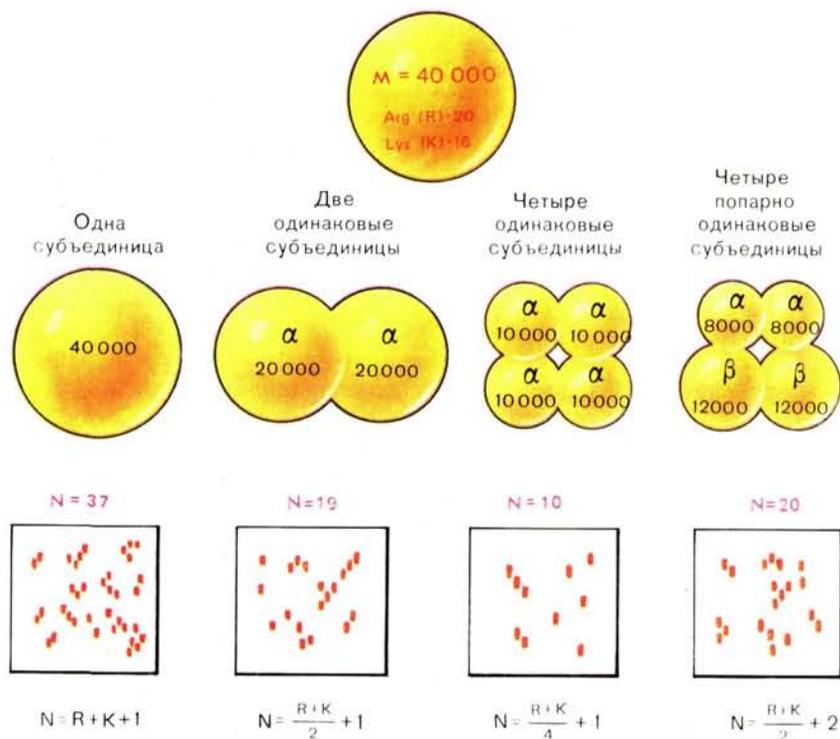


Рис. 69. Анализ субъединичной структуры белка методом пептидных карт.

Процесс формирования четвертичной структуры белков проходит в соответствии со строгими законами термодинамики. Силы, способствующие ассоциации белка, должны быть скомпенсированы таким образом, чтобы активные группировки, расположенные в областях, имеющих тенденции к ассоциации, не оставались экспонированными наружу. В белках, построенных из одинаковых субъединиц, последние практически всегда находятся в эквивалентном (или идентичном) окружении. На рисунке 70 представлены возмож-

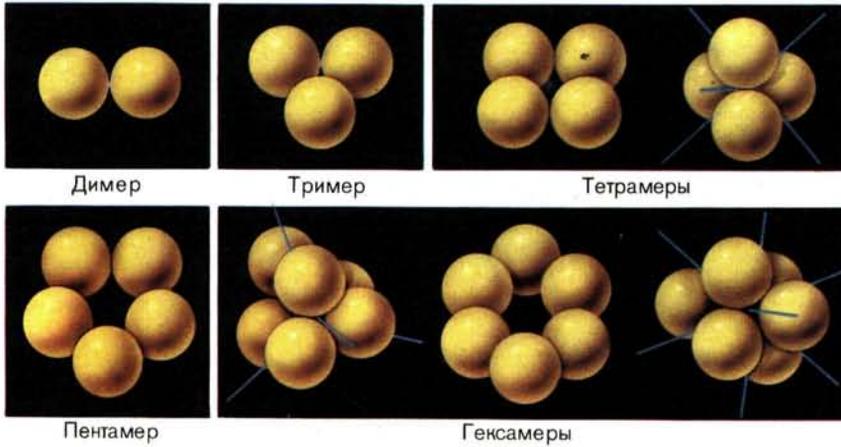


Рис. 70. Пространственные формы белков, состоящие из идентичных субъединиц.

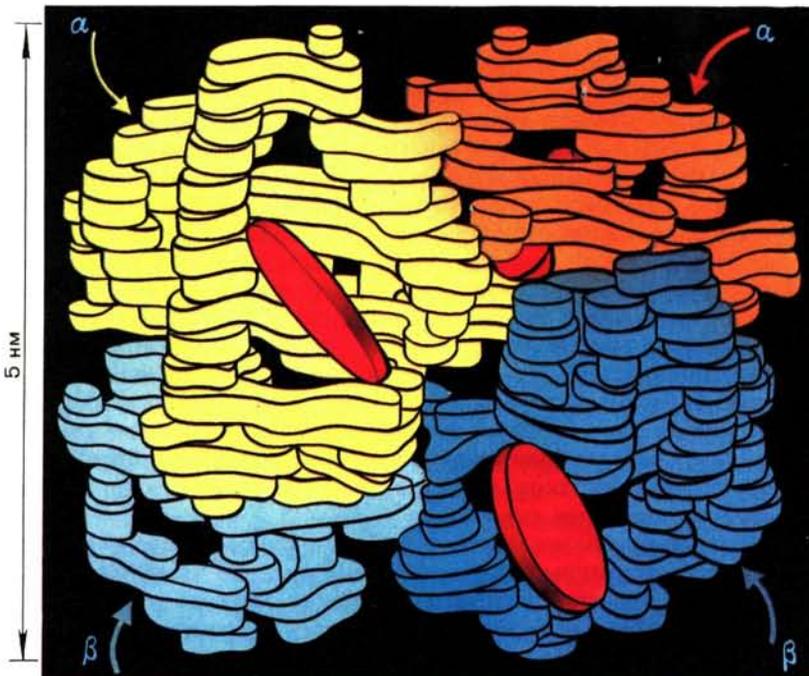


Рис. 71. Четвертичная структура оксигемоглобина.

ные пространственные формы белков, состоящих из разного числа (до 6) идентичных субъединиц. Для ди-, три- и пентамеров в каждом случае имеется только одна форма, причем следует подчеркнуть, что олигомерные белки с нечетным числом субъединиц крайне редки. У тетрамеров существует две формы — квадрат и тетраэдр, а у гексамеров — три формы (трехгранная призма, шестиугольник и октаэдр).

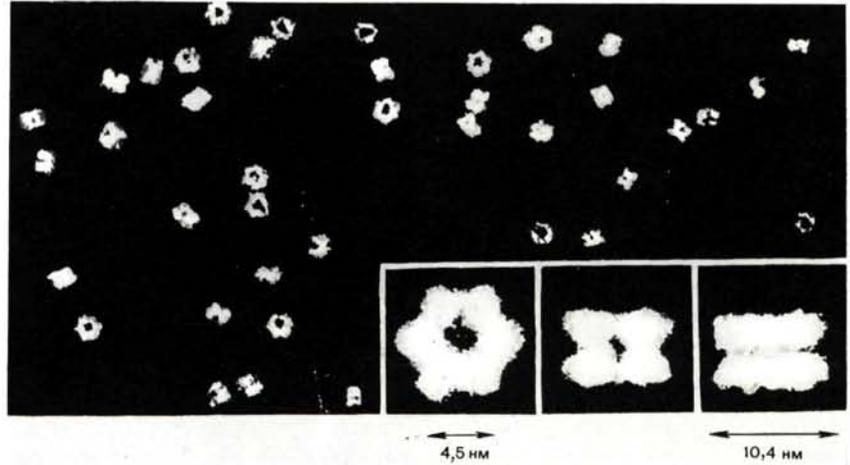


Рис. 72. Электронная микрофотография глутаминсинтетазы *E. coli*.

Взаимодействие между комплементарными участками субъединиц в четвертичной структуре осуществляется с помощью ван-дер-ваальсовых сил, ионных и водородных связей.

Формирование четвертичной структуры из трех и более субъединиц протекает с промежуточным образованием агрегатов меньшего размера. Агрегация первых мономеров часто облегчает присоединение последующих — в этом смысле образование четвертичной структуры является кооперативным процессом.

Имеется ряд физико-химических методов исследования геометрии субъединиц в белках, обладающих четвертичной структурой. Наиболее информативный среди них — метод рентгеноструктурного анализа. Классическими являются рентгеноструктурные исследования гемоглобина, проводившиеся в Кембридже М. Перутцем и сотр. в течение 25 лет, начиная с 1937 г. Была установлена субъединичная структура гемоглобина — $\alpha_2\beta_2$. С каждой субъединицей связано по одной гем-группе (см. с. 205), атом железа которой может обратимо связывать молекулу O_2 . На рисунке 71 представлена четвертичная структура оксигемоглобина. Можно видеть, что контакты образуются преимущественно между α - и β - и в меньшей степени между α - α - и β - β -цепями белка. Большинство контактов возникает за счет взаимодействия гидрофобных боковых цепей аминокислотных остатков, часть из них обусловлена водородными и электростатическими связями.

Электронная микроскопия — информативный метод анализа четвертичной структуры белков, особенно крупных молекул со многими субъединицами. Главные ограничения метода — сравнительная «прозрачность» белков по отношению к пучку электронов и их недостаточная стабильность в условиях эксперимента. Обычно

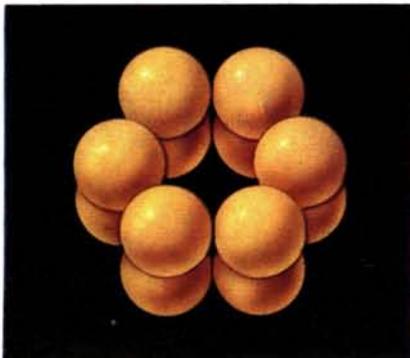


Рис. 73. Модель четвертичной структуры глутаминсинтетазы *E. coli*.

удается проводить структурный анализ с разрешением до 2 нм, а при соблюдении определенных предосторожностей — до 1 нм. На рисунке 72 представлена электронная микрофотография глутаминсинтетазы *E.coli* — фермента, осуществляющего синтез глутамина из глутаминовой кислоты, NH_4^+ и АТФ и играющего ключевую роль в метаболизме азота. Глутаминсинтетаза состоит из 12 идентичных субъединиц с молекулярной массой 50 000 каж-

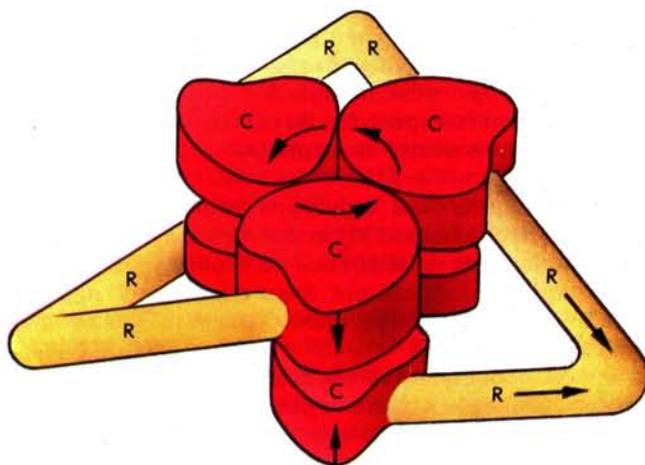


Рис. 74. Модель четвертичной структуры аспарат-транскарбамоилазы.

дая, уложенных в два параллельных гексагональных кольца. На рисунке 73 изображена пространственная модель фермента, полученная на основании данных электронной микроскопии.

Совместное использование электронной микроскопии и рентгеноструктурного анализа дало возможность установить четвертичную структуру еще более сложно устроенного фермента — аспарат-транскарбамоилазы *E.coli*, катализирующего основную реакцию в биосинтезе пиримидиновых нуклеотидов — образование N-карбамоиласпарагиновой кислоты из аспарагиновой и карбамоилфосфорной кислот. В состав фермента входит 12 субъединиц — 6 каталитических (С-субъединицы) и 6 регуляторных (R-субъединицы) с молекулярными массами 33 500 и 17 000 соответственно. Согласно пространственной модели (Х. Шахман, 1972), С-субъединицы объединены в тримеры, расположенные один над другим, а R-субъединицы находятся на периферии молекулы, взаимодействуют друг с другом и с С-субъединицами (рис. 74).

Для исследования четвертичной структуры белков широко используется химическая модификация, в частности, бифункциональными реагентами (см. с. 168). С помощью такого подхода была изучена пространственная структура ДНК-зависимой РНК-полимеразы *E.coli*, состоящей из пяти субъединиц (две идентичные α -субъединицы по 36500, β_1 , β' и δ -субъединицы — 150 000, 155 000 и 70 000 соответственно). Проводилась модификация бифункциональными реагентами как самого фермента, так и его комплекса с фрагментами ДНК-матрицы, содержащими промоторные участки. В последнем случае использовались фрагменты ДНК, несущие фоточувствительные группировки (частично депурированные или содержащие остатки 5-бром урацила). На основании этих данных была



Перуц [Perutz] Макс Фердинанд (р. 1914), английский биохимик. Окончил Венский университет (1936), с 1962 г. — руководитель лаборатории молекулярной биологии Кембриджского университета. Расшифровал с помощью рентгеноструктурного анализа пространственное строение молекулы гемоглобина и предложил ее модель (1960). Лауреат Нобелевской премии по химии (1962, совместно с Дж. Кендрию).

предложена пространственная модель расположения субъединиц РНК-полимеразы в бинарном комплексе с промоторным участком ДНК (А. Д. Мирзабеков, 1981) (рис. 75).

Возникает вопрос: почему многие белки состоят из субъединиц? Какие преимущества это дает по сравнению с одной длинной пептидной цепью? Во-первых, наличие субъединичной структуры позволяет «экономить» генетический материал. Для олигомерных белков, состоящих из идентичных субъединиц, резко уменьшается размер структурного гена и соответственно длина матричной РНК.

Во-вторых, при сравнительно небольшой величине цепей уменьшается влияние случайных ошибок, которые могут возникнуть в процессе биосинтеза белковых молекул. Кроме того, возможна дополнительная выбраковка «неправильных», ошибочных полипептидов в процессе ассоциации субъединиц в единый комплекс.

В-третьих, наличие субъединичной структуры у многих белков позволяет клетке легко регулировать их активность, например, путем смещения равновесия ассоциация — диссоциация в ту или иную сторону.

Наконец, субъединичная структура облегчает и ускоряет процесс молекулярной эволюции. Мутации, приводящие лишь к небольшим конформационным изменениям на уровне третичной структуры за счет многократного усиления этих изменений при переходе к четвертичной структуре, могут способствовать появлению у белка новых свойств.

Характерной особенностью белков с четвертичной структурой является их способность к самосборке. Легко происходит, например, самосборка гемоглобина из смеси α - и β -цепей. Таким образом, в аминокислотной последовательности полипептидных цепей олигомерного белка закодированы как бы два уровня информации: один

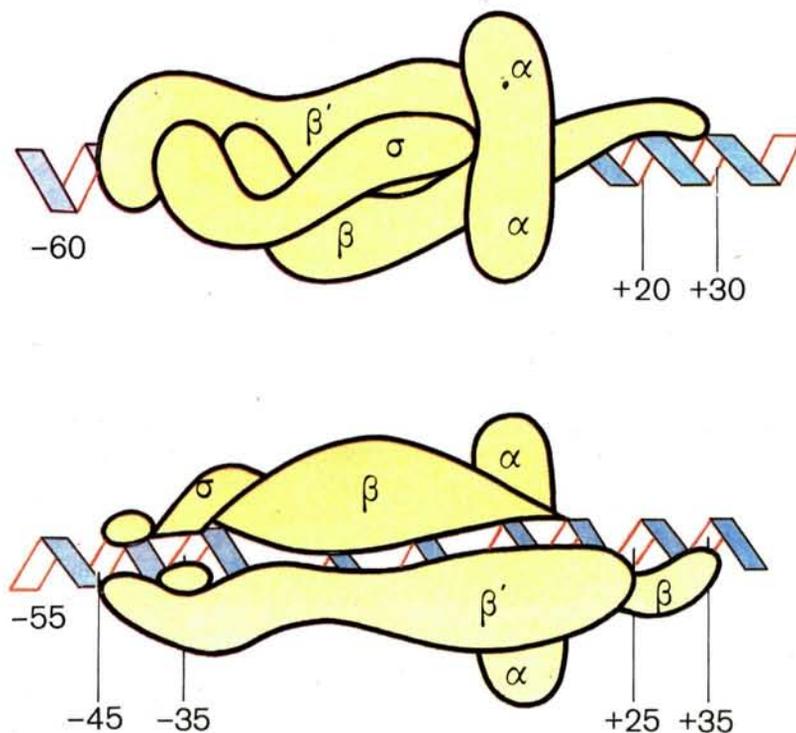


Рис. 75. Пространственная модель комплекса РНК-полимеразы *E. coli* с фрагментом ДНК-матрицы. Цифрами обозначены местоположения нуклеотидных звеньев вдоль цепи ДНК (отсчет от точки инициации транскрипции).

из них определяет трехмерную структуру отдельных полипептидных цепей, а второй, поскольку каждая субъединица содержит специфические участки связывания с другими субъединицами, определяет четвертичную структуру всей многокомпонентной молекулы в целом.

Крупные надмолекулярные белковые комплексы являются самоорганизующимися системами. Характерный пример такого рода — система синтетаз жирных кислот (из дрожжей), состоящая из 7 различных ферментов. Каждый из этих ферментов, в свою очередь, построен из 3-х, по-видимому, идентичных субъединиц. Показано, что по отдельности все компоненты системы неактивны, но при их смешении образуется активный мультиферментный комплекс (Ф. Линен, 1964).

Высокая способность к самоорганизации присуща таким надмолекулярным системам, как вирус табачной мозаики (ВТМ) и рибосома (см. с. 403). Частица ВТМ построена из 2130 идентичных белковых субъединиц (каждая из которых содержит 158 аминокислотных остатков) и одной цепи РНК длиной около 6400 нуклеотидов. Х. Френкель-Конрат в 1962 г. получил активные вирусные частицы, способные заражать растения табака, при смешении очищенных субъединиц белка оболочки и молекулы вирусной РНК.

Электронно-микроскопические исследования позволили установить последовательность реконструкции вирусных частиц (рис. 76). Субъединицы образуют двойной диск с 17-кратной вращательной симметрией, который присоединяется к молекуле РНК ВТМ у ее 3-конца. Последующие субъединицы полимеризуются на этом диске, наращивая спираль (16 $\frac{1}{3}$ субъединицы на один оборот) до тех пор, пока не закроется 5'-конец РНК ВТМ.

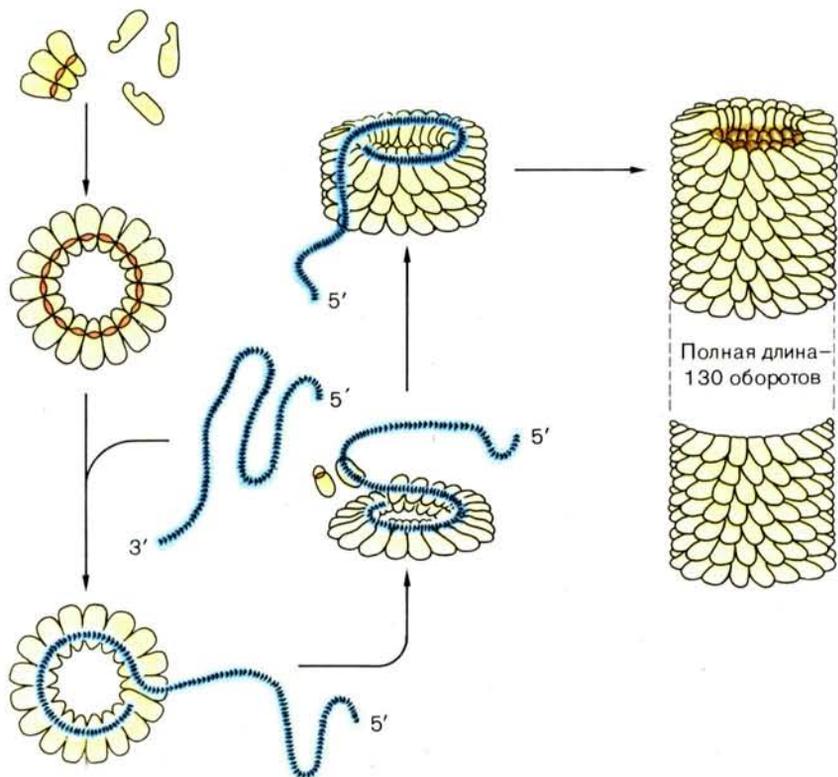


Рис. 76. Реконструкция частиц ВТМ из субъединиц белка оболочки и молекулы вирусной РНК.

Химический синтез и химическая модификация белков и пептидов

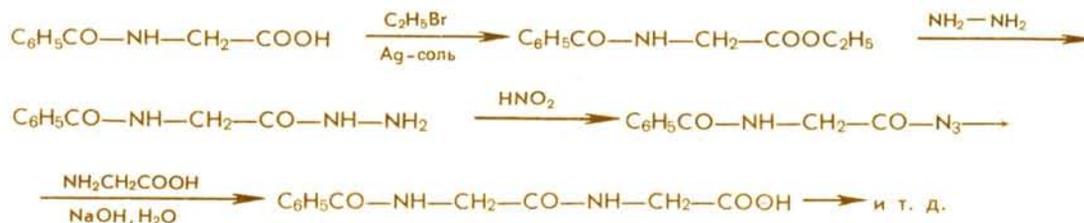
Химический синтез пептидов и белков

Пептидный синтез — это построение пептидной цепи путем соединения аминокислот с помощью химических методов. Обычно речь идет о получении пептидов, содержащих до 40 — 45 аминокислот, таким способом можно осуществить синтез и небольших белков.

Пептидный синтез служит надежным средством доказательства строения природных пептидно-белковых веществ. Синтетические пептиды широко используются для структурно-функциональных исследований. С помощью химических методов удается получать аналоги биологически активных пептидов, в том числе циклические производные с заданными свойствами (например, с пролонгированным, усиленным или избирательным действием), а также аналоги с остатками небелковых аминокислот. Синтетические пептидные фрагменты белков применяются для изучения их антигенных свойств и получения специфичных к отдельным участкам полипептидных цепей антител, используемых в структурно-функциональном анализе и в создании диагностикумов и вакцин. Методами пептидного синтеза получают (в том числе и в промышленном масштабе) многие практически важные препараты для медицины и сельского хозяйства.

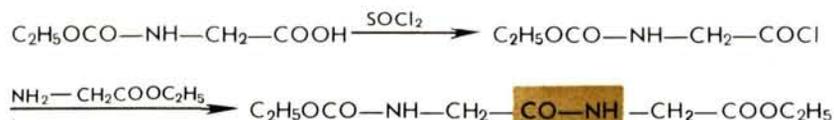
Исторический очерк. Первое производное пептида было получено синтетически в 1882 г. Т. Курциусом при обработке серебряной соли глицина бензоилхлоридом; в продуктах реакции наряду с другими соединениями был обнаружен кристаллический N-бензоилглицилглицин. Однако «отцом пептидного синтеза» считают Э. Фишера, впервые получившего в 1901 г. свободный глицилглицин при частичном гидролизе дикетопиперазинов (последние легко образуются из эфиров аминокислот). Э. Фишер первым понял значение пептидного синтеза как средства доказательства строения белка и необходимость разработки специфических методических приемов.

Т. Курциус не признавал приоритета Э. Фишера и в 1902 г., вновь обратившись к проблеме пептидного синтеза, предложил

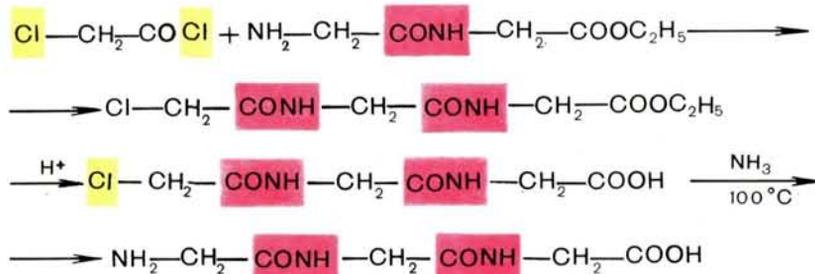


эффективный метод конденсации, основанный на использовании азидов аминокислот. Метод состоял в превращении N-бензоилглицина в этиловый эфир, затем в гидразид обработкой гидразином и далее в азид с помощью азотистой кислоты. Реакционноспособный азид легко реагировал с глицином или глицилглицином. Таким способом были получены пептиды, содержащие до 7 аминокислотных остатков, однако селективно отщепить N-бензоильную группу не удалось и это существенно ограничивало возможности метода. Азидный метод сохранил свое значение до настоящего времени, что подтверждает основополагающий вклад Т. Курциуса в становление пептидной химии.

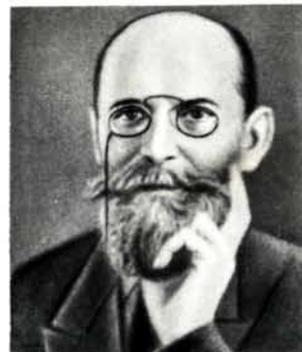
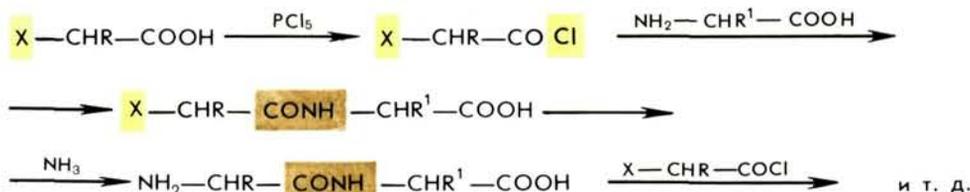
В 1903 г. Э. Фишер предложил хлорангидридный способ получения пептидов: карбэтоксиглицин с помощью хлористого тионила превращался в хлорангидрид, которым ацилировался этиловый эфир глицина:



Щелочная обработка продукта реакции не привела к свободному пептиду. Отсутствие N-ацильных группировок, удаляемых без расщепления пептидных связей, побуждало искать новые варианты этого способа, в одном из которых в качестве ацилирующего компонента был использован хлорацетилхлорид:



Дальнейшее усовершенствование галогенацильного метода связано с применением галогенангидридов разнообразных α -галогенкарбоновых кислот, например:



Фишер [Fischer] Эмиль Герман (1852—1919), немецкий химик-органик, иностранный почетный член Петербургской АН (1913). Образование получил в Боннском и Страсбургском университетах. Выполнял фундаментальные исследования по химии различных природных соединений. Разработал методы синтеза производных пурина, углеводов, пептидов, обнаружил и объяснил специфичность действия ферментов. Провел первые исследования аминокислотного состава белков. Экспериментально доказал (1902), что аминокислоты связываются между собой посредством карбоксильной группы и аминогруппы, образуя пептиды. Лауреат Нобелевской премии по химии (1902).

Э. Фишеру удалось получить (совместно с его учеником О. Варбургом) L- α -бромпропионилхлорид и перейти к синтезу оптически активных пептидов. Им было установлено, что превращение производных α -галогенкарбоновых кислот в производные аминокислот может протекать как с сохранением конфигурации, так и с ее обращением (впоследствии это явление было названо вальденовским обращением, по имени П. И. Вальдена).

В 1906 г. сочетанием галогенацильного и дикетопиперазинового методов Э. Фишер получил первый крупный пептид, состоящий из 10 аминокислотных остатков: $\text{H}-(\text{D,L})\text{-Leu}-(\text{Gly})_8\text{Gly}-\text{OH}$. Несколько позже комбинацией различных методов ему удалось синтезировать оптически активный 18-членный пептид следующего строения:



Это было выдающееся достижение своего времени, и Э. Фишер даже утверждал, что он близок к синтезу белка. Однако, хотя им и был осуществлен синтез более 100 пептидов, проблема получения пептидов заданного строения в тот период не могла быть решена из-за чрезвычайной ограниченности и несовершенства используемых методов.

Заметным событием в истории пептидного синтеза является открытие Г. Лейксом в 1906 г. N-карбоксиангидридов аминокислот, легко полимеризующихся с образованием полиаминокислот. Несмотря на то, что полиаминокислоты существенно отличаются от обычных пептидов, они сыграли важную роль в качестве модельных соединений в исследовании пространственного строения белков. Значение N-карбоксиангидридов резко возросло после 1947 г., когда Р. Вудворд и К. Шрамм показали возможность получения с их помощью сополимеров различных аминокислот. В 1966 г. Р. Хиршман использовал N-карбоксиангидриды и для регулируемого синтеза биологически активных белков (см. с. 143).

В течение длительного времени главным препятствием на пути дальнейшего прогресса в пептидном синтезе являлось отсутствие селективно удаляемых защитных групп. И хотя поиски велись весьма интенсивно и в 1926 г. Р. Шёнхаймер предложил использовать *p*-толуолсульфонильную (тозилную) группу для защиты NH_2 -группы, подлинная революция совершилась лишь в 1932 г., когда ученик Э. Фишера М. Бергманн и Л. Зервас открыли карбобензоксигруппу $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2\text{OSO}$.

Эра химического синтеза биологически активных природных пептидов началась с работ В. Дю Виньо по синтезу пептидных гормонов окситоцина и вазопрессина (1953). Через десять лет, в 1963—1965 гг., были осуществлены полные синтезы инсулина (Х. Цан, П. Катсояннис, Я. Кунг); в 1963 г. Р. Швицер и П. Зибер завершили полный синтез 39-членного гормона кортикотропина. Несколько раньше, в 1956 г., Р. Швицером был получен первый природный циклический пептид — грамицидин S. Эти достижения стимулировали усилия по поиску новых эффективных методов создания пептидной связи, защитных группировок, способов очистки и идентификации пептидов.

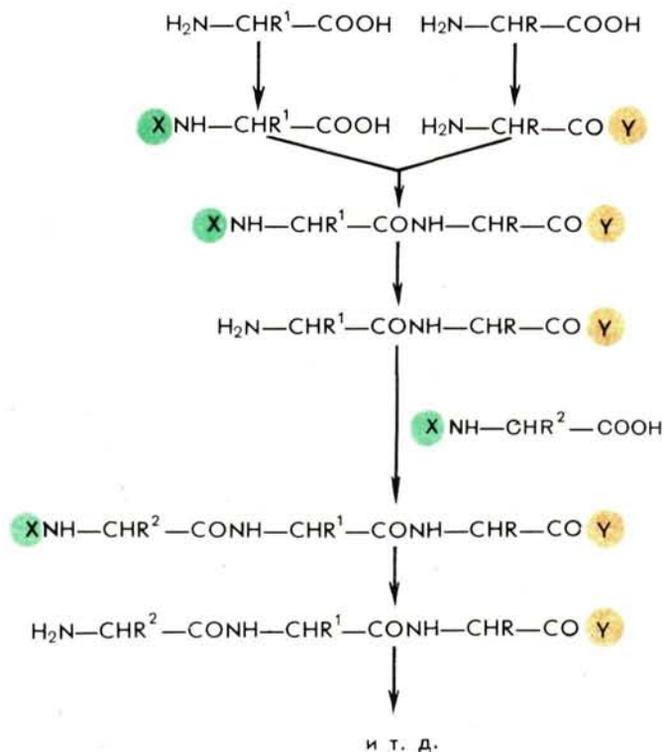
Современный пептидный синтез располагает богатым арсеналом методических возможностей и представляет собой высокоразвитую область биоорганической химии.

В общем случае синтез любого пептида состоит из трех основных стадий: блокирования (защиты) не участвующих в реакции функ-



Курциус [Curtius] Теодор (1857—1928), немецкий химик. Образование получил в Гейдельбергском и Лейпцигском университетах; профессор Кильского (1889), Боннского (1897) и Гейдельбергского (1898) университетов. Ему принадлежат основополагающие труды в области органического синтеза — получение гидразина, гидразидов, азидов кислот. Описал (1890) реакцию превращения азидов кислот в первичные амины (реакция Курциуса). Выполнил первые синтезы пептидов и ввел в практику пептидной химии азидный метод.

циональных групп аминокислоты или пептида; конденсации активированной карбоксильной группы одного компонента с аминогруппой другого; селективного или полного удаления защитных групп для продолжения синтеза или получения свободного пептида.



Бергманн [Bergmann] Макс (1886—1944), немецкий химик-органик, ученик Э. Фишера. С 1934 г. работал в Рокфеллеровском институте в Нью-Йорке (США). Разработал ряд методов получения пептидов. Открыл реакцию циклизации N-галогенациламино кислот с образованием азлактонов (реакция Бергманна). Совместно с Л. Зервасом предложил способы получения ряда производных аминокислот, в частности N-карбобензоксипроизводных (1932—1934).



Зервас [Zervas] Леонидас (1902—1980), греческий химик-органик, иностранный член АН СССР (1976). Образование получил в Афинском и Берлинском университетах, с 1939 г.— профессор Афинского университета. Основные работы посвящены химии пептидов. Разработал ряд методов защиты и активирования функциональных групп в ходе синтеза пептидов (совместно с М. Бергманном), в частности метод получения и применения N-карбобензоксипроизводных. Предложил способ введения о-нитрофенилсульфенильной группы.

В зависимости от используемых методических приемов и характера синтезируемого конечного продукта различают следующие типы пептидного синтеза:

1. Классический пептидный синтез в растворе, подразделяемый на ступенчатый синтез линейных пептидов, осуществляемый последовательным присоединением аминокислот от С-конца к N-концу цепи, и на блочный синтез линейных пептидов, когда построение цепи ведется из предварительно синтезированных фрагментов.

2. Синтез пептидов на полимерном носителе, при этом растущая полипептидная цепь ковалентно присоединена к нерастворимому или растворимому полимеру и отделение ее от полимера осуществляется на завершающей стадии синтеза. При использовании нерастворимого носителя принято говорить о твердофазном синтезе, существующем в настоящее время в полностью автоматизированном варианте. Созданные для этих целей приборы получили название синтезаторов. В некоторых случаях оказывается целесообразным использовать жидкофазный синтез на основе растворимых полимеров.

3. Синтез гомо- и гетерополиаминокислот, построенных из повторяющихся остатков одной-двух аминокислот путем полимеризации или сополимеризации производных аминокислот (N-карбоксиангидридов и т. п.).



Вальден (Walden) Пауль (Павел Иванович) (1863—1957), известный физико-химик, академик Петербургской АН (1910), иностранный почетный член АН СССР (1927). Окончил Рижский политехнический институт (1889) и Лейпцигский университет (1891); с 1902 г. — профессор Рижского политехнического института, затем — профессор Ростокского университета и университетов Франкфурта-на-Майне и Тюбингена. Основные работы — в области стереохимии и физической химии. Открыл явление обращения конфигурации у асимметрического атома углерода при замещении (1898, вальденовское обращение). Обнаружил оптически активные соединения в нефти.

4. *Ферментативный пептидный синтез*, т. е. синтез пептидов с помощью ферментов. Хотя идея такого синтеза весьма привлекательна и многие ферменты способны катализировать образование пептидной связи (реакции, обратной протеолизу), существенных результатов пока этим методом получить не удалось.

5. *Полусинтез пептидов* заключающийся в использовании методов пептидного синтеза для модификации природных пептидов. Обычным приемом является отщепление в молекуле природного пептида или белка небольшого фрагмента, а затем введение новой аминокислотной последовательности.

6. *Синтез циклических пептидов*, осуществляемый замыканием линейного пептида в цикл соответствующей величины различными способами.

7. *Синтез гетеродетных пептидов*, построенных с участием как амидных связей, так и связей другого типа — сложноэфирных, тиоэфирных, дисульфидных.

Защитные группы, используемые в пептидном синтезе

В пептидном синтезе существуют два типа защитных групп — постоянные и временные. Постоянными называют группировки, используемые для защиты боковых функциональных групп и удаляемые на заключительном этапе синтеза пептида. Временными являются защитные группы для N^α-концевой аминогруппы и С-концевого карбоксила, снимаемые соответственно перед каждой стадией удлинения цепи или конденсации фрагментов.

Защитные группы, используемые в синтезе пептидов, должны удовлетворять следующим условиям:

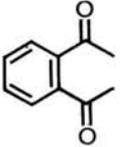
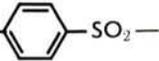
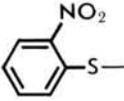
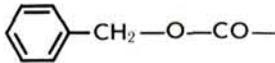
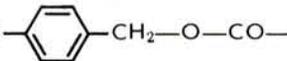
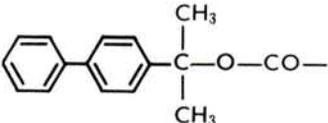
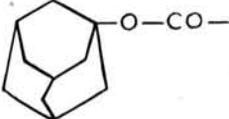
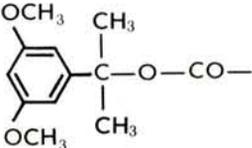
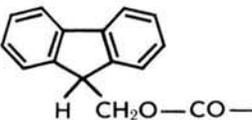
- полностью блокировать соответствующую группировку от участия в проводимых химических реакциях;
- быть устойчивыми в ходе удаления других защитных групп;
- не вызывать побочных реакций и рацемизации при введении, удалении и при образовании пептидных связей;
- защищенные производные должны быть устойчивыми идентифицируемыми соединениями;
- не вызывать осложнений с растворимостью и выделением пептидов из реакционных смесей.

NH₂-Защитные группировки. В таблице 5 приведены наиболее распространенные защитные группы для N-концевых и N^ε-аминогрупп.

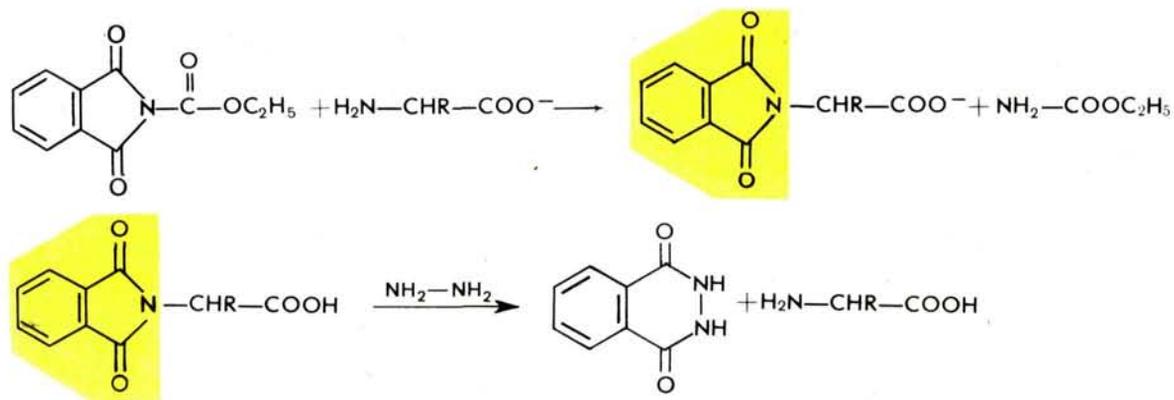
Таблица 5

NH₂-Защитные группы

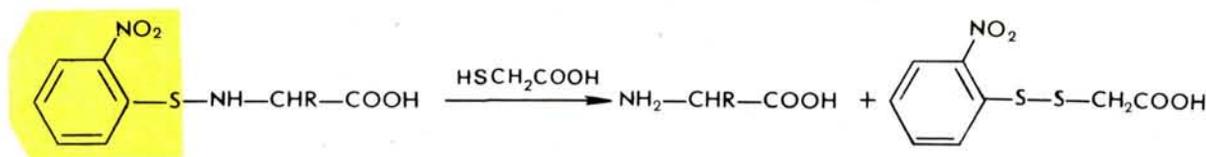
№ п/п	Группа	Формула	Сокращение	Условия отщепления	Год открытия	Авторы
1	Формильная	HCO—	Form	1 н. HCl/CH ₃ OH; гидразиндиацетат в CH ₃ OH; фенилгидразин; H ₂ O	1905	Э. Фишер, О. Варбург
2	Трифторацетильная	CF ₃ CO—	Tfa	0,2 н. NaOH; разб. NH ₄ OH	1952	Ф. Вейганд, Е. Ксенде

№ п/п	Группа	Формула	Сокращение	Условия отщепления	Год от-крытия	Авторы
3	Фталильная		Pht	Гидразинолиз	1948	Д. Кидд, Ф. Кинг
4	п-Толуолсульфонильная (тозилъная)	CH_3 -  -	Tos	Na/NH ₃	1926	Р. Шёнхаймер
5	о-Нитрофенилсульфенильная		Nps	Мягкий ацидолиз, тиолиз (тиоацетамид, тиогликолевая кислота)	1963	Л. Зервас, Д. Боровас, Е. Газис
6	Бензилоксикарбонильная (карбобензокси-)		Z	H ₂ /Pd; HBr/CF ₃ COOH; HF	1932	М. Бергманн, Л. Зервас
7	трет-Бутилоксикарбонильная	(CH ₃) ₃ C-O-CO-	Boc	CF ₃ COOH; 2 н. HCl/диоксан; BF ₃ ·Et ₂ O/CH ₃ COOH; HCOOH; HF	1957	Ф. Мак-Кей, Н. Албертсон
8	п-Метоксибензилоксикарбонильная	CH ₃ O-  -	MZ	То же	1957	Ф. Мак-Кей, Н. Албертсон
9	2-(4-Бифенилил)пропил-2-оксикарбонильная		Bpsc	1% CF ₃ COOH	1968	П. Зибер, Б. Изелин
10	1-Адамантил-оксикарбонильная		Adoc	CF ₃ COOH	1966	Б. Хаас, Э. Крамкалис, К. Герзон
11	Метилсульфонилэтил-оксикарбонильная	CH ₃ SO ₂ CH ₂ CH ₂ O-CO-	Msc	NaOH, pH 10,0-12,0; 0°C	1975	Г. Тессер, И. Бальверт-Гирс
12	α,α-Диметил-3,5-диметоксибензилоксикарбонильная		Ddz	5% CF ₃ COOH, фотолиз	1972	Х. Бирр, В. Лохингер, С. Штапке, П. Ланг
13	9-Флуоренилметил-оксикарбонильная		Fmoc	Морфолин или пиперидин в ДМФА	1970	Л. Карпино, Г. Хен

Защитные группы ацильного типа не используются в качестве временных защитных группировок из-за невозможности их удаления без расщепления пептидных связей (например, бензоильная или ацетильная группы) и легко происходящей рацемизации при получении активированных производных. Формильная и трифтор-ацетильная группы (1 — 2) находят применение для защиты N^ε-групп лизина. Фталильную (3) и тозилльную (4) группы используют редко из-за жесткости условий их удаления (гидразинолизом и обработкой Na в жидком аммиаке соответственно). Для получения фталиламинокислот свободные аминокислоты ацилируют в водно-щелочном растворе при 20 °С карбэтоксифталимидом:



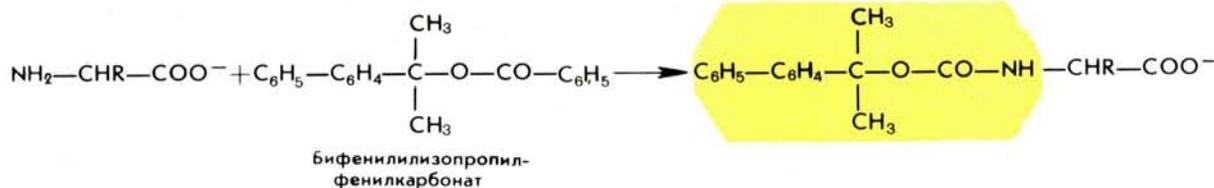
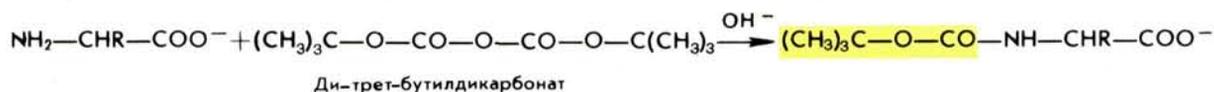
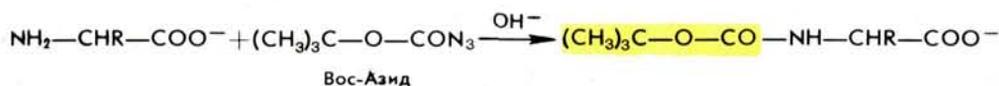
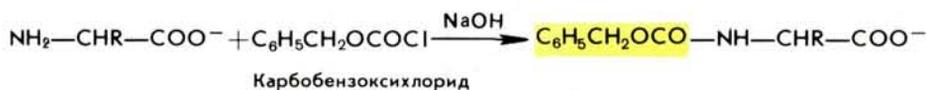
Защитные группы алкильного (арильного) типа также используются сравнительно редко. Исключением является Nps-группа (5), которая легко вводится с помощью соответствующего хлорида, а удаляется с помощью ацидолиза или тиолиза.



Наиболее широко применяются защитные группы уретанового типа (6 — 13). Они вводятся с помощью соответствующих хлоридов, азидов или карбонатов (см. с. 131). Удаление их проводится каталитическим гидрогенолизом (в случае серосодержащих пептидов — гидрированием в жидком аммиаке) или так называемым «переносным гидрированием» с использованием в качестве донора

1,4-циклогександиена, циклогексена, муравьиной кислоты или формиата аммония. Часто применяется и ацидолиз в различных условиях (HBr/CH₃COOH, CF₃COOH, 2н. HCl в диоксане, HF и т. п.).

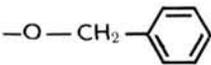
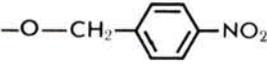
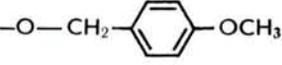
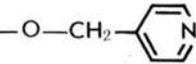
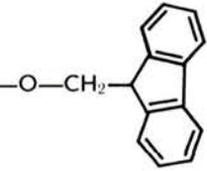
Среди уретановых группировок несомненный интерес представляют устойчивые к ацидолизу, но удаляемые мягким щелочным гидролизом 9-флуоренилметилоксикарбонильная (Fmoc, 13) и метилсульфонилэтилоксикарбонильная (Msc, 11). Fmoc-Группа широко применяется, в частности, в твердофазном синтезе пептидов.



COOH-Защитные группировки. В таблице 6 приведены сложно-эфирные группировки, используемые в настоящее время для защиты карбоксильной функции.

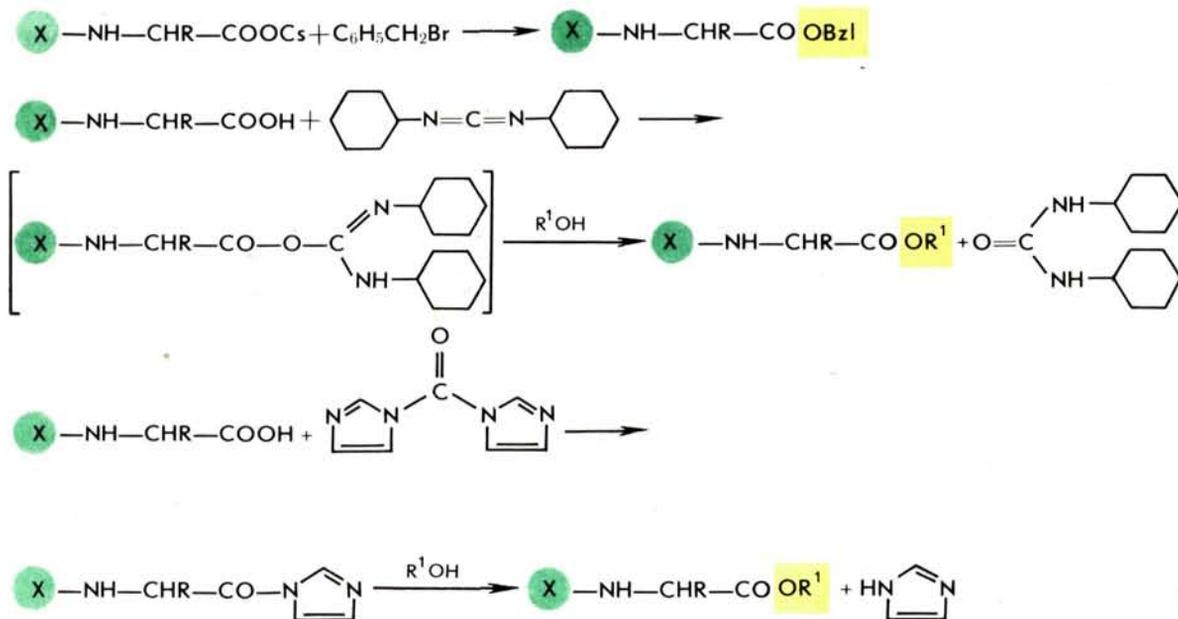
Наиболее широко применяются бензиловые и трет-бутиловые эфиры, реже — метиловые и этиловые эфиры. Бензиловые эфиры и их производные получают прямой этерификацией аминокислот в присутствии кислотных катализаторов или обработкой защищенных производных аминокислот бензилбромидом в щелочной среде. В тех случаях, когда этерификация не может быть использована, применяются специальные реагенты, обычно рекомендуемые для

COOH-Защитные группы

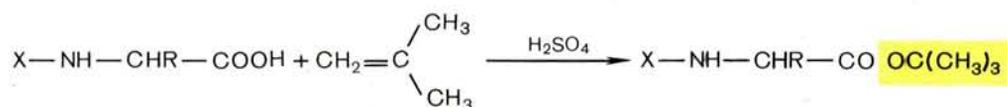
№ п/п	Сложный эфир	Формула	Сокращение	Условия отщепления	Год открытия	Авторы
1	Бензиловый		OBzl	H ₂ /Pd, OH ⁻	1929	П. Роччи, Р. Ратти, Е. Хенци
2	п-Нитробензиловый		OBzl(NO ₂)	H ₂ /Pd; OH ⁻	1955	Р. Швицер, Б. Изелин, М. Ферер
3	п-Метоксибензиловый		OBzl(OMe)	CF ₃ COOH, 0°; H ₂ /Pd	1962	Ф. Вейганд, К. Хунгер
4	трет-Бутиловый	-O-C(CH ₃) ₃	OBu ^t	CF ₃ COOH; HCl/CH ₂ Cl ₂	1959	Е. Ташнер, Б. Либер, К. Василевский
5	4-Пиколиловый		OPic	OH ⁻ ; H ₂ /Pd; Na/NH ₃	1969	Р. Кэмбл, Р. Гарнер, Г. Янг
6	Фенациловый	-O-CH ₂ -CO-C ₆ H ₅	OPac	H ₂ /Pd; тиофенолят натрия	1964	Дж. Шизен, Г. Дэвис
7	9-Флуоренилметило- вый		OFm	10%-ный пиперидин, вторичные или третичные амины в ДМФА	1983	М. Беднарек, М. Боданский
8	Фениловый	-O-C ₆ H ₅	OPh	OH ⁻ /H ₂ O ₂ (рН 10,5)	1972	Г. Кеннер, Дж. Сили

образования сложноэфирных связей, а именно: N,N'-дициклогексилкарбодиимид (часто в присутствии катализатора 4-диметиламинопиридина) и N,N'-карбонилдиимдазол.

Синтез
и химическая модификация
белков и пептидов



трет-Бутиловые эфиры аминокислот получают присоединением изобутилена в условиях кислотного катализа, например:



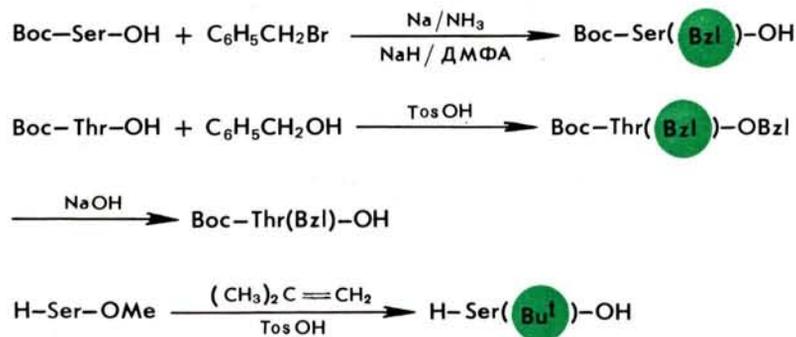
Для блокирования карбоксильных групп в ряде случаев применяют солеобразование, хотя при этом не исключаются побочные реакции в ходе синтеза. Выбор COOH-защитных групп в пептидном синтезе не столь велик и не всегда обеспечивает потребности экспериментатора, особенно в тех случаях, когда синтезируются пептиды, содержащие аспарагиновую и глутаминовую кислоты.

Защитные группировки для функциональных групп боковых цепей аминокислот. В ходе пептидного синтеза обычно оказывается необходимым защищать функциональные группы боковых цепей аминокислотных остатков; в любом случае следует блокировать ε-NH₂-группы лизина и SH-группы цистеина. Блокирование других боковых функциональных групп не всегда строго обязательно.

Существуют два различных тактических подхода к синтезу пептидов — с максимальной защитой боковых функций аминокислот и с минимумом защитных группировок. В первом случае удается резко ограничить возможность побочных реакций в ходе синтеза, а во втором — существенно облегчить конечное деблокирование защищенного производного пептида. Выбор соответствующего варианта определяется в основном природой синтезируемого пептида. Так как сохранение реакционноспособных функциональных групп в пептиде сокращает методические возможности экспериментатора, в подавляющем числе синтезов защищают боковые группы Ser, Thr, Tyr, Arg, His, Asp, Glu. Важнейшие из защитных группировок перечислены в таблице 7.

Для гидроксилсодержащих аминокислот наиболее употребительны бензильная и трет-бутильная защитные группы. Boc-Ser(Bzl)-OH получают прямым алкилированием Boc-Ser-OH бензилбромидом в присутствии натрия в жидком аммиаке или гидрида натрия в диметилформамиде (выход около 50%). Boc-Thr(Bzl)-OH более труднодоступен, выход его в тех же условиях составляет лишь 10%. С таким же низким выходом O-бензил-треонин получают и при этерификации карбоксильной и гидроксильной групп бензиловым спиртом в присутствии п-толуолсульфокислоты с последующим щелочным омылением сложного эфира.

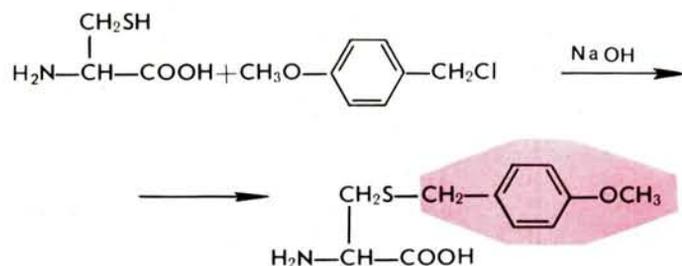
O-трет-Бутиловые эфиры гидроксиаминокислот образуются с хорошим выходом при обработке свободных аминокислот или их метиловых эфиров изобутиленом в присутствии кислоты (H_2SO_4 , $TosOH \cdot BF_3 \cdot Et_2O$). O-Бензилтирозин получается при алкилировании медного комплекса тирозина бензилбромидом:



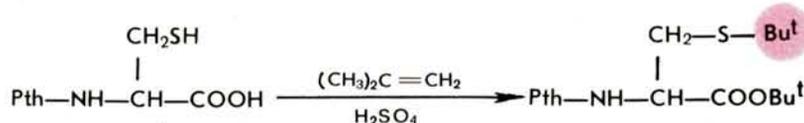
Основной побочной реакцией при ацидолитическом удалении бензильной группы тирозина является алкилирование (бензил-катионом) его ароматического кольца с образованием 3-бензилтирозина. Для уменьшения степени протекания этого процесса при обработке пептидов жидким HF обычно используют защитные добавки («скэвенджер») для реакционноспособных катионов. Ряд защитных групп для тирозина, хорошо зарекомендовавших себя в твердофазном синтезе (группа 3, 4 и особенно 5, табл. 7), отличаются существенно меньшей способностью алкилировать кольцо Tug при ацидолизе. Эти группы вводятся путем обработки производных тирозина соответствующим алкилгалогенидом (например, 2,6-дихлорбензилбромидом или циклогексенон в присутствии $BF_3 \cdot Et_2O$).

Для защиты меркаптогруппы цистеина широко употребляются группы 7 — 10, ранее применявшаяся S-бензильная группа (6) уступила место другим, более легко удаляемым группировкам.

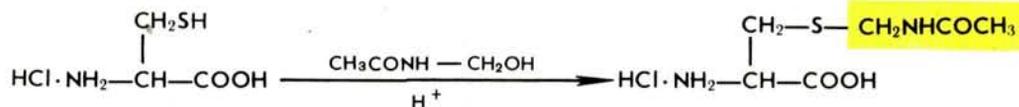
Обычным способом получения S-бензилцистеина, S-(п-метокси) бензилцистеина и S-третилцистеина является обработка цистеина в щелочной среде соответствующим хлоридом, например:



S-трет-Бутилпроизводные получают при действии изобутилена в присутствии кислых агентов H_2SO_4 , $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$, $\text{HBr}/\text{CH}_3\text{COOH}$ и др.):

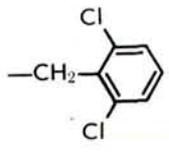
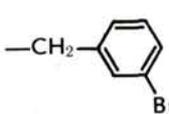
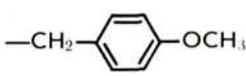


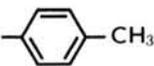
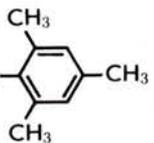
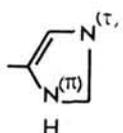
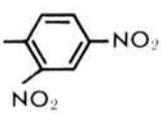
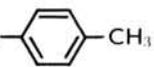
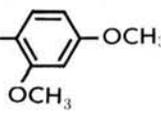
Широко применяемая ацетамидометильная группировка вводится обработкой цистеина в кислой среде ацетамидометанолом:



В силу высокой основности боковая цепь аргинина в большинстве случаев в условиях синтеза остается протонированной и протонирование является одним из вариантов защиты гуанидиновой группы. Защитные группы для гуанидиновой группировки, удовлетворяющие всем необходимым требованиям, пока не найдены. Нашедшие применение Arg(Tos)- или Arg(Mts)-производные получают обработкой Z-Arg, Boc-Arg или (MeO)Z-Arg соответствующим хлоридом (Tos-Cl или Mts-Cl) в сильнощелочной водно-органической фазе.

Защита функциональных групп

№ п/п	Защищаемая группа	Блокирующая группа	Формула	Сокращение	Условия отщепления	Год открытия	Авторы
1	—OH (Ser, Thr, Tyr)	Бензильная	$-\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$	Bzl	H_2/Pd ; $\text{HBr}/\text{CF}_3\text{COOH}$; $\text{HF}/\text{анизол}$	1954	К. Окава
2	— " —	трет-Бутильная	$-\text{C}(\text{CH}_3)_3$	Bu ^t	CF_3COOH	1957	Г. Андерсон, А. Мак-Грегор
3	—OH (Tyr)	2,6-Дихлорбензильная		Cl ₂ Bzl	$\text{HF}/\text{анизол}$ (0 °C, 30 мин)	1973	Д. Ямаширо, Ч. Ли
4	— " —	3-Бромбензильная		BrBzl	То же	1975	С. Пена, Дж. Стюарт, А. Паладини и др.
5	— " —	Циклогексильная		cHex	$\text{HF}/\text{анизол}$ (0 °C, 30 мин)	1978	М. Энгельгард, Р. Меррифилд
6	—SH (Cys)	Бензильная	$-\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$	Bzl	Na/NH_3 ; $\text{HF}/\text{анизол}$ (20 °C, 30 мин)	1935	Р. Зифферд, В. Дю Виньо
7	— " —	п-Метоксibenзильная		MBzl	$\text{HF}/\text{анизол}$ (0 °C, 30 мин); $\text{CF}_3\text{COOH}/\text{Hg}^{2+}$; Na/NH_3	1964	С. Акабори, С. Сакакибара, Я. Шимониши и др.
8	— " —	Тритильная	$-\text{C}(\text{C}_6\text{H}_5)_3$	Trt	Соли Hg^{2+} , Ag^+ ; I_2 ; CF_3COOH — $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{SH}$ (1:1)	1956	Л. Зервас, Д. Теодоропулус
9	— " —	Ацетиламидометильная	$-\text{CH}_2\text{NHCOCH}_3$	Acsm	Соли Hg^{2+} (20 °C, 60 мин, pH 4,0); I_2	1968	Д. Вебер, Д. Милковский, Р. Денкефальтер, Р. Хиршман

№ п/п	Защищаемая группа	Блокирующая группа	Формула	Сокращение	Условия отщепления	Год открытия	Авторы
10	-SH (Cys)	<i>tert</i> -Бутилтио	-S-C(CH ₃) ₃	SBu	Тиолиз (тиофенол; HS-CH ₂ COOH; HO-CH ₂ -CH ₂ -SH)	1969	Э. Вюнш, Р. Спангенберг
11	-NH-C-NH ₂ NH (N ^G , Arg)	N ^ω -Нитро	-NO ₂	NO ₂	H ₂ /Pd; Na/NH ₃ , HF/анизол	1934	М. Бергманн, Л. Зервас, Х. Ринке
12	- " -	N ^ω -Тозильная	-SO ₂ -  -CH ₃	Tos	Na/NH ₃ ; HF/анизол (0°C, 30 мин)	1958	Р. Швицер, Ч. Ли
13	- " -	N ^ω -Моно-или N ^{ω,δ} -добен- зилоксикарбо- нильная	-CO-O-CH ₂ - 	Z	H ₂ /Pd; HBr/CH ₃ COOH	1957	Л. Зервас, М. Виниц, Дж. Гринштейн
14	- " -	N ^ω -Мезитилен- 2-сульфонильная	-SO ₂ -  -CH ₃	Mts	HF/анизол; CF ₃ CO ₂ H; CH ₃ SO ₃ H	1978	Х. Яджима, М. Такеяма, Дж. Канаки, К. Митани
15		Динитрофе- нильная		Dnp	Тиолиз (меркапто- этанол, pH 8,0)	1967	С. Шалтиел
16	- " -	Тозильная	-SO ₂ -  -CH ₃	Tos	HF (0°C, 30 мин) HOBT	1969	С. Сакакибара, Т. Фуджи
17	- " -	N ^π -Бензил- симетильная	-CH ₂ -OCH ₂ C ₆ H ₅	Bom	H ₂ /Pd	1981	Т. Браун, Дж. Джонс
18	-CONH ₂ (Asn, Gln)	Бензгидрильная	-CH(C ₆ H ₅) ₂	Bzh	HF/анизол	1967	С. Сакакибара и сотр.
19	- " -	2,4-Диметокси- бензильная	-CH ₂ -  -OCH ₃	Dml	CF ₃ COOH/анизол; HF/анизол	1968	Ф. Вейганд, В. Стеглих, Дж. Бьёрнсон

При введении защитных групп в боковую цепь гистидина возможно образование двух производных по л- или т-атому азота имидазольного кольца; в условиях обычной обработки N^α-защищенного гистидина арил-, алкил- или ацилгалогенидами в щелочной среде образуются в основном т-производные.

Наиболее распространенной, хотя и не идеальной, защитной группой для имидазольного кольца гистидина является тозилная (Tos, 16).

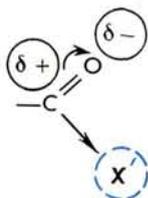
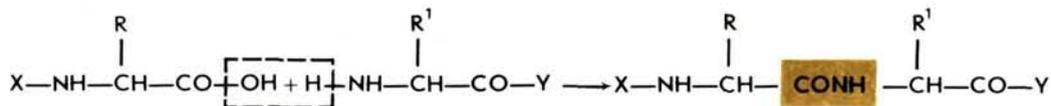
Предложенная в 1981 г. Т. Брауном и Дж. Джонсом N^{im}- (л)-бензилоксиметильная группировка (Bom, 17) оказалась наиболее удовлетворяющей всем требованиям, так как получающиеся производные устойчивы к рацемизации, действию нуклеофилов и щелочей. Boc—His(Bom)—OH синтезируют обработкой Boc—His(τ-Boc)—OMe бензилхлорметилловым эфиром с последующим омылением метилового эфира:



Блокирование боковых N-карбоксамидных групп аспарагина и глутамина в пептидном синтезе применяется сравнительно редко. В некоторых случаях все же приходится использовать защитные группировки, наиболее употребительны из них группы 18 и 19.

Методы создания пептидной связи

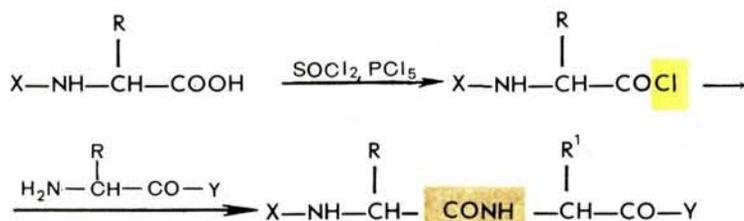
Образование пептидной связи в общем сводится к отщеплению элементов воды.



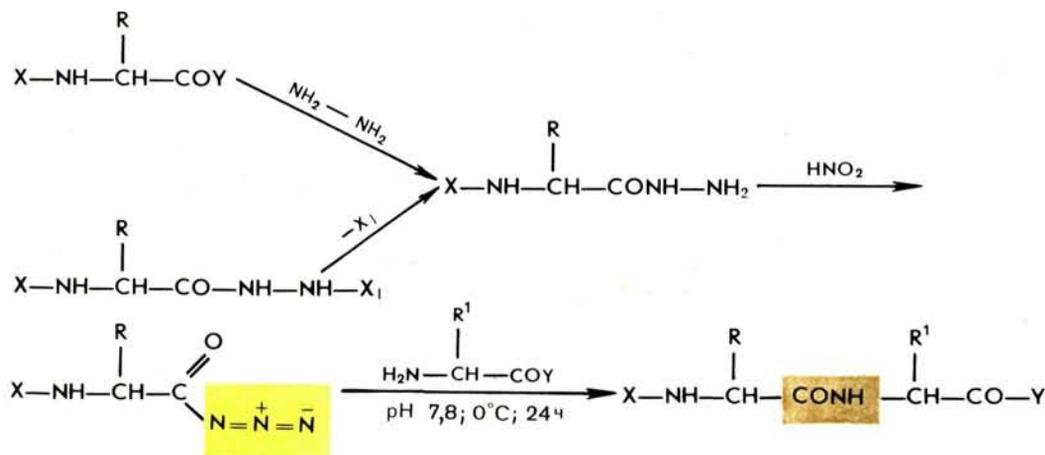
Для того чтобы сделать эту реакцию возможной и, более того, обеспечить ее высокую скорость и полноту, необходимо «активировать» карбоксильную группу. Такая активация должна сводиться к увеличению электрофильности карбонильного углерода (C^{δ+}).

Как легко видеть, важная роль в этом случае принадлежит группе X', которая в конечном счете определяет эффективность активации. Методы конденсации обычно и различаются природой группы X'.

Хлорангидридный метод. Хлорангидридный метод, упоминавшийся в историческом очерке, в настоящее время применяется редко, так как сопровождается рацемизацией и образованием побочных продуктов. Хлорангидриды получаются обычно обработкой производных аминокислот и пептидов хлористым тионилем или пятихлористым фосфором.

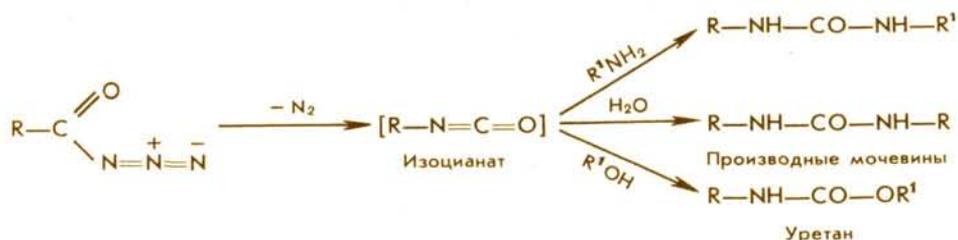


Азидный метод. Метод Т. Курциуса находит широкое применение в синтезе пептидов.



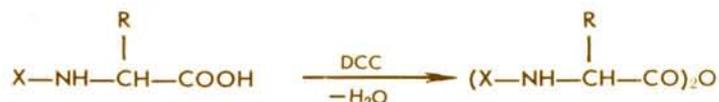
Гидразиды получают либо прямым гидразинолизом эфиров защищенных аминокислот или пептидов, либо из защищенных гидразидов ($-\text{CO}-\text{NH}-\text{NH}-\text{Z}-$, $-\text{CO}-\text{NH}-\text{NH}-\text{Woc}$ и т. д.). Перевод в азиды осуществляется обработкой водным раствором нитрита натрия в кислой среде при -5°C или действием изоамилнитрита или трет-бутилнитрита при -20°C в органическом растворителе (модификация Хонцля и Рудингера, 1961). Азиды можно получать и непосредственно из HOOC -производных с помощью дифенилфосфорилиазида $\text{N}_3\text{PO}(\text{OC}_6\text{H}_5)_2$, применяемого в качестве конденсирующего агента (в частности, для получения циклопептидов).

Азидный метод не свободен от недостатков. Основная побочная реакция — перегруппировка Курциуса:

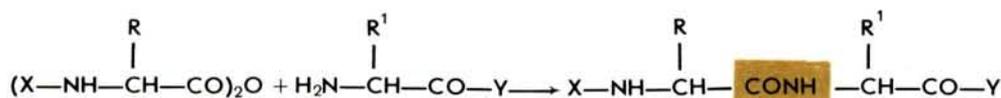


Направление и степень протекания этой перегруппировки определяется структурой азида и условиями реакции. Хотя при азидной конденсации рацемизация сведена к минимуму, ее нельзя не учитывать, особенно при блочном синтезе; в качестве основания рекомендуется использовать не триэтиламин-, а N-метилморфолин или N-этилдиизопропиламин.

Метод ангидридов. Симметричные ангидриды ациламино кислот легко получают обработкой последних дициклогексилкарбодиимидом (ДСС) или этоксиацетиленом, например:

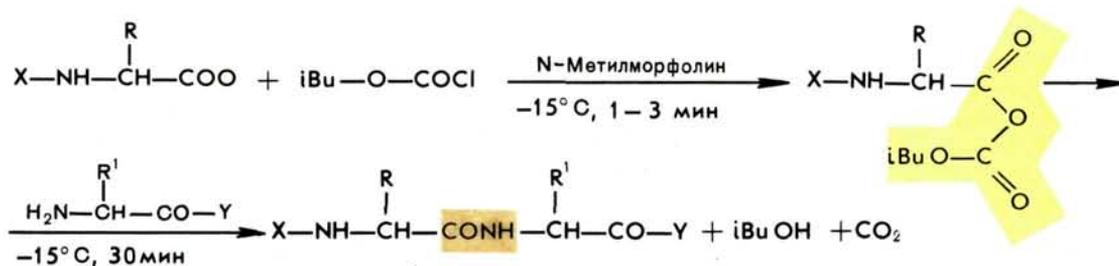


При реакции с аминок компонентом образуются пептиды:



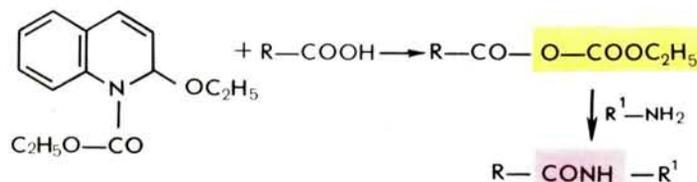
Метод в последнее время используется в твердофазном синтезе (см. с. 65).

Более распространенным является применение смешанных ангидридов, в частности с производными угольной кислоты, получаемых с помощью изобутилхлоркарбоната (Р. Воган, 1951).



Быстрый ступенчатый метод синтеза пептидов с использованием избытка смешанных ангидридов носит название *REMA-синтеза*.

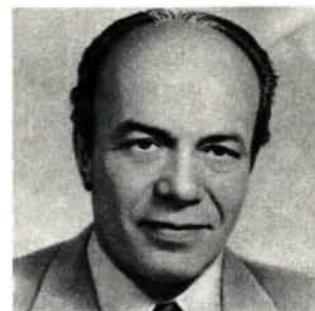
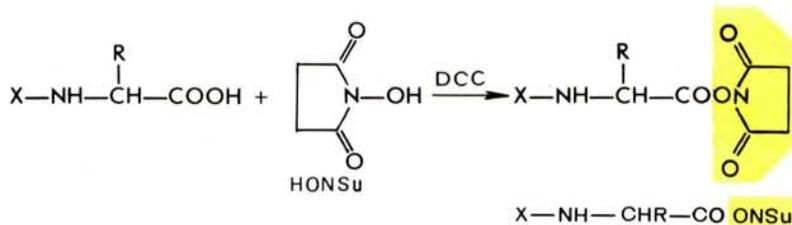
К этой группе методов можно отнести и синтез пептидов с применением в качестве конденсирующего средства 1-этоксикарбонил-2-этокси-1,2-дигидрохинолина. Перспективны также смешан-



ные ангидриды на основе производных ацилоксифосфония, получаемые с помощью дифенилфосфорилхлорида $(\text{C}_6\text{H}_5\text{O})_2\text{POCl}$, тетраэтилпирофосфита $(\text{C}_2\text{H}_5\text{O})_2\text{POPO}(\text{OC}_2\text{H}_5)_2$ или дифенилфосфинилхлорида $(\text{C}_6\text{H}_5)_2\text{POCl}$. Основные побочные процессы при их использовании — это образование уретанов или оксазолонов и диспропорционирование.

Метод активированных эфиров. Среди арильных активированных эфиров наиболее широко используются *p*-нитрофениловые ($-\text{ONp}$) (М. Боданский, 1956), 2,4-динитрофениловые, *o*-нитрофениловые и *o*-нитротиафениловые, 2,4,5-трихлорфениловые ($-\text{OTcp}$), пентахлорфениловые ($-\text{OPcp}$). Особое значение приобрели недавно предложенные Л. Кишфалуди высокорекреационноспособные пентафторфениловые эфиры ($-\text{OPfp}$). Ариловые эфиры этих типов получают обычно из соответствующих фенолов с помощью карбодиимида.

В последние годы большое распространение получили активированные эфиры на основе производных гидроксимида, и прежде всего *N*-гидроксисукцинимидные эфиры, например:



Кишфалуди (Kisfaludy) Лайош (р. 1924), венгерский химик-органик. Окончил Будапештский технический университет (1948), с 1956 г. возглавляет исследовательскую лабораторию фармацевтической фирмы «Гедеон Рихтер». Основные работы посвящены химии пептидов. Предложил применить высокорекреационноспособные пентафторфениловые эфиры для синтеза пептидов в растворе.

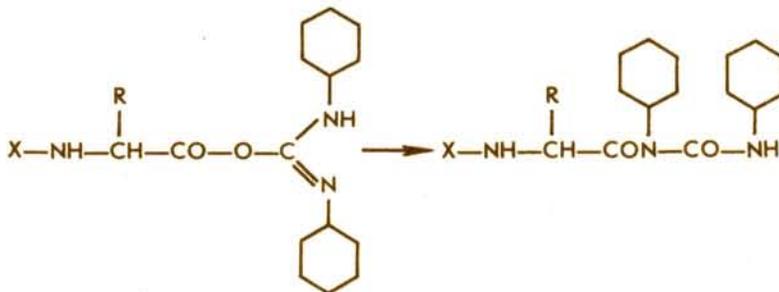
Разновидностью метода активированных эфиров является конденсация с помощью дициклогексилкарбодиимида в присутствии добавок — *p*-нитрофенола, *N*-гидроксисукцинимиды, 1-гидроксибензотриазола (HOBT) или пентафторфенола; часто в этом случае используется так называемый «F-комплекс», состоящий из трех молекул пентафторфенола и одной молекулы дициклогексилкарбо-



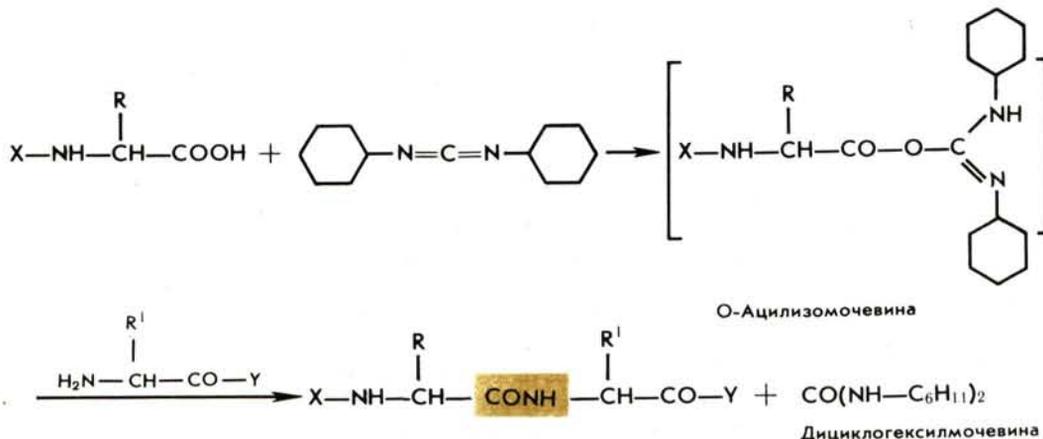
Шизн (Sheehan) Джон Кларк (р. 1915), американский химик-органик. Окончил Мичиганский университет (1941), в 1952—1971 гг. — профессор Массачусетского технологического института в Кембридже (США). Основные работы посвящены синтетической органической химии. Разработал карбодиимидный метод синтеза пептидов (1955—1958). Синтезировал пенициллин (1957). Исследовал структуру ряда важных антибиотиков.

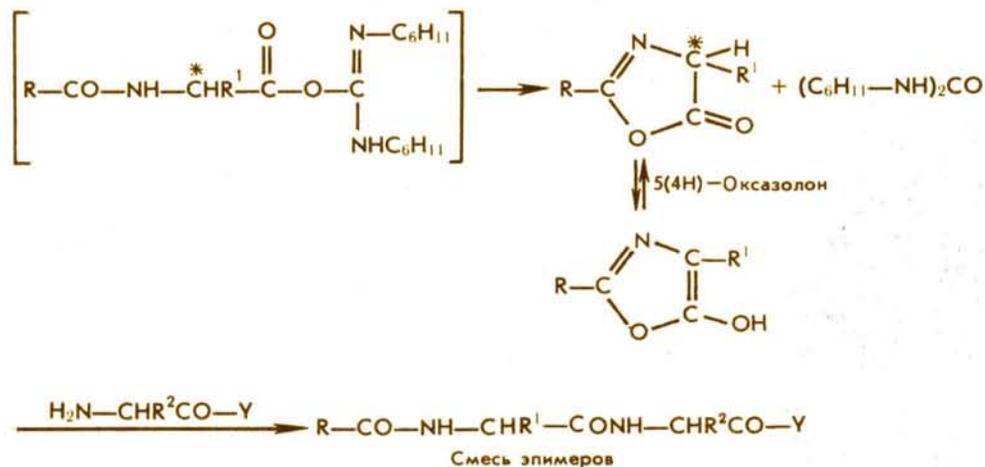
диимида. Специально можно отметить конденсацию с помощью дициклогексилкарбодиимида и 1-гидроксибензотриазола, которая позволяет получать продукты высокой степени оптической чистоты, в том числе и в случае производных гистидина (что обычно трудно достигается другими методами).

Карбодиимидный метод. Дициклогексилкарбодиимид предложен в 1955 г. Дж. Шизном и Г. Хессом при синтезе пенициллина (см. с. 724). Первой стадией реакции является активирование карбоксильного компонента путем образования реакционноспособного производного O-ацилизоомочевина.

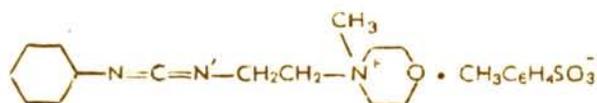
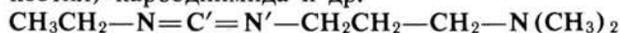


Производное O-ацилизоомочевина превращается в пептид непосредственно или через соответствующий симметричный ангидрид. Главным побочным процессом является O → N-ацильный сдвиг, приводящий к получению неактивных побочных продуктов — N-ацилизоомочевин.





В настоящее время широко применяются так называемые водорастворимые карбодиимиды: 1-этил-(3-диметиламинопропил)-карбодиимид, *p*-толуолсульфонат (1-циклогексил-3-(2-метилморфолиноэтил)-карбодиимида и др.

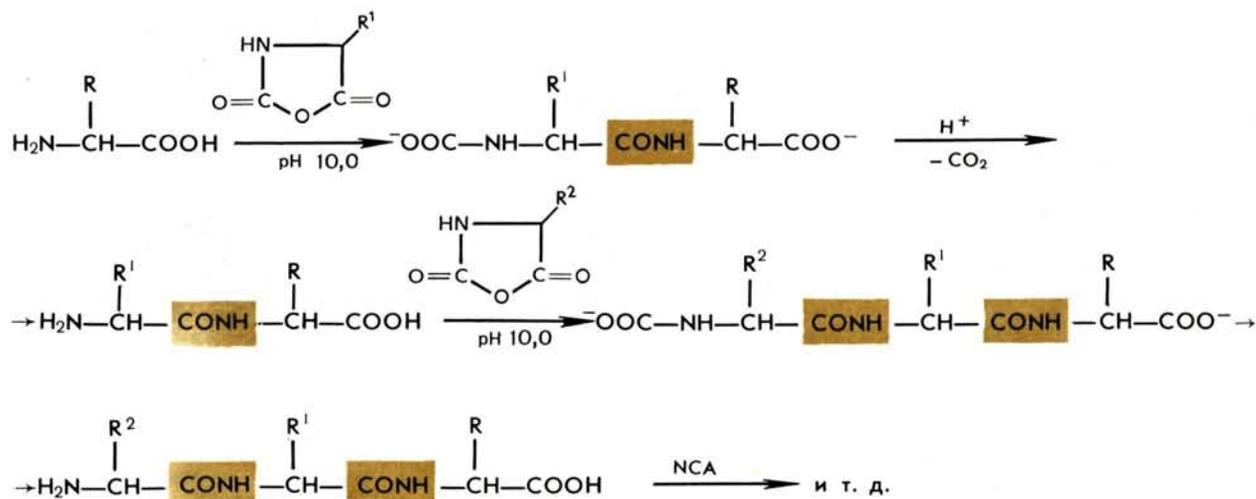


Поразительно, что в этом случае речь идет о водоотнимающих реагентах, успешно функционирующих и в водных растворах.

Карбоксиангидридный метод. В 1966 г. Р. Хиршман предложил использовать для направленного синтеза пептидов в водной среде *N*-карбоксиангидриды (NCA, ангидриды Лейкса, оксазолидиндионы).

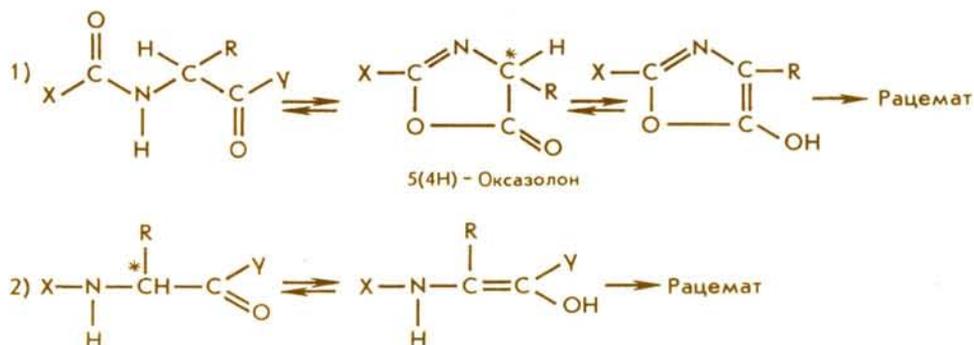
Суть предложенного им приема заключается в точном регулировании pH среды: конденсация *N*-карбоксиангидрида с аминокислотой проводится при pH 10,2, при подкислении осуществляется *N*-декарбоксилирование производных карбаминовой кислоты, и затем цикл реакций повторяется (иногда такой прием обозначается

как «pH-весы»). Этим методом, в котором построение цепи ведется от С- к N-концу, Р. Хиршман получил весьма длинные пептидные фрагменты S-белка рибонуклеазы (см. с. 191).



Рацемизация, т. е. полная или частичная потеря оптической чистоты одного или более аминокислотных остатков, является главной побочной реакцией в пептидном синтезе, накладывающей жесткие ограничения на выбор защитных групп и методов конденсации. Рацемизация приводит к образованию оптически неоднородных продуктов, разделение которых по мере удлинения цепи резко осложняется и превращается в практически неосуществимую задачу.

Реакция рацемизации протекает по двум механизмам: 1) через образование 5(4H)-оксазолонов (часто называемых азлактонами) или 2) через енолизацию:



В общем случае степень инверсии у α -углеродного атома (рацемизации) определяется природой заместителей X, R, Y, температурой и pH среды.

Аминокислоты и их неактивированные производные заметно рацемизируются в сильноокислой или щелочной среде, особенно при нагревании. Активированные производные аминокислот более подвержены рацемизации как в процессе их получения, так и в ходе аминолиза. Особенно легко рацемизируются производные пептидов, что осложняет проведение конденсации фрагментов. Следует отметить, что уретановые N-защитные группировки аминокислот (в том числе наиболее популярные Z- и Boc-группы) обладают низкой склонностью к образованию оксазолонов. Поэтому ступенчатый синтез с использованием этих групп — один из наиболее надежных путей избежать рацемизации при синтезе пептидов.

Синтез на полимерном носителе. Пептидный синтез в классическом варианте сопряжен со значительными затратами труда и времени. С целью создания более эффективной методологии Р. Меррифилд в 1963 г. предложил твердофазный метод синтеза пептидов. Идея его состоит в закреплении растущей полипептидной цепи на полимерном нерастворимом носителе. При этом значительно упрощаются операции выделения промежуточных продуктов, которые сводятся к экстракции и фильтрованию полимера, полностью снимается проблема нерастворимости пептидов и создаются предпосылки для автоматизации процесса. Определяющим фактором в твердофазном синтезе является полнота протекания всех химических реакций, которая достигается за счет применения избытка конденсирующего агента и N-защитной аминокислоты, отделяемых экстракцией. Естественно, выбор защитных группировок и методов конденсации должен обеспечить полное отсутствие рацемизации. Наилучшие результаты достигаются при использовании



Меррифилд [Merrifield] Роберт (р. 1921), американский химик-биоорганик. Окончил Калифорнийский университет в Лос-Анжелесе (1943), с 1966 г. — профессор Рокфеллеровского университета (Нью-Йорк). Разработал известный метод твердофазного синтеза пептидов (1962) и осуществил синтез брадикинина, ангиотензина и рибонуклеазы. Лауреат Нобелевской премии по химии (1984).

Рис. 77. Схема твердофазного синтеза пептидов.

1. Получение полимера с активной группировкой

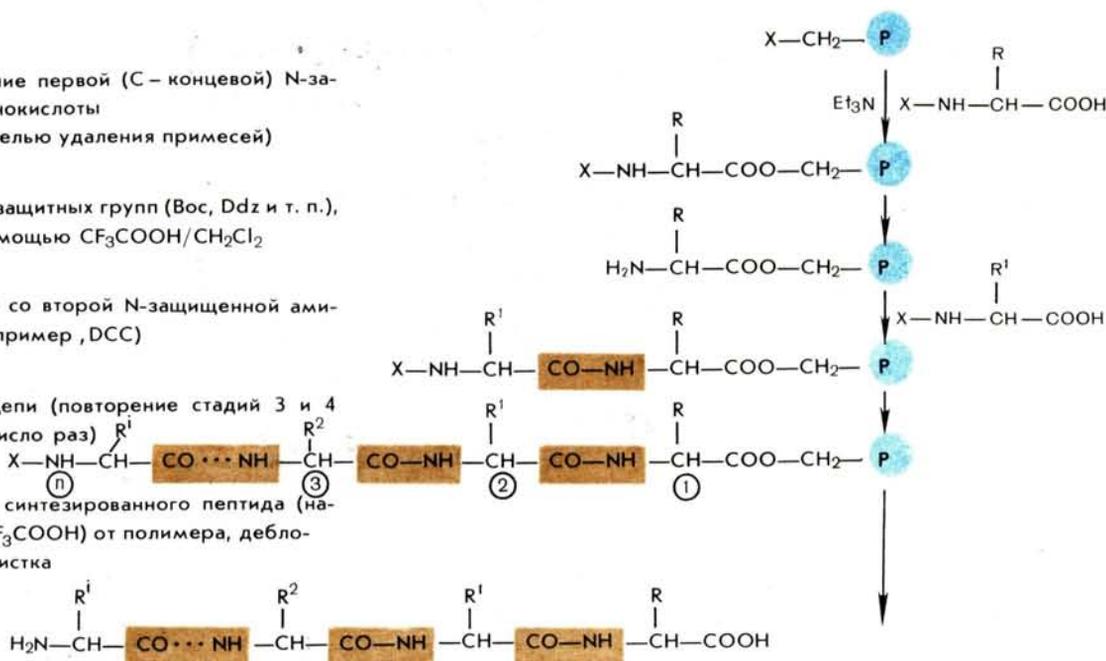
2. Присоединение первой (C-концевой) N-защитной аминокислоты
(и промывка с целью удаления примесей)

3. Удаление N-защитных групп (Boc, Ddz и т. п.), например с помощью $\text{CF}_3\text{COOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$

4. Конденсация со второй N-защитной аминокислотой (например, DCC)

5. Удлинение цепи (повторение стадий 3 и 4 необходимое число раз)

6. Отщепление синтезированного пептида (например, $\text{HBr}/\text{CF}_3\text{COOH}$) от полимера, деблокирование и очистка





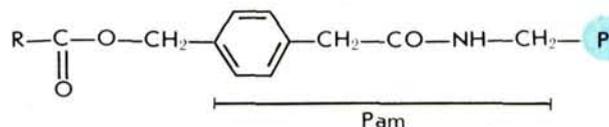
Хиршман [Hirschman] Ральф Ф. (р. 1922), американский химик-органик. Окончил Висконсинский университет (1948), работает в исследовательской лаборатории фирмы «Мерк». Известен работами по синтезу пептидов и выяснению связи между структурой и функцией пептидных гормонов (тиролиберин, соматостатин). Применил N-карбоксиянгидриды для направленного синтеза пептидов.

Вос-, Врос- и Fтос-защитных групп, методов симметричных ангидридов и дициклогексилкарбодиимидного. Успешное проведение синтеза на твердом полимере требует применения высокоочищенных реагентов и растворителей на всех стадиях процесса. Первый твердофазный синтез гормона брадикинина был проведен Р. Мерфилом с общим выходом 70%.

В качестве носителя наиболее широко используется микропористый хлорметилированный сополимер стирола и дивинилбензола, хорошо набухающий в органических растворителях и обладающий химической и механической прочностью.

Нагрузка полимера растущими пептидными цепями, как правило, невелика и составляет 0,1 — 0,3 ммоль пептида на 1 г полимера. Полнота реакции ацилирования оценивается на основании реакции с нингидрином или флуорескамином (см. с. 35 и 36) или физико-химическими методами.

С целью повышения кислотоустойчивости «якорных» группировок, связывающих пептид с полимером, в настоящее время применяются полимерные смолы с фенилацетамидометильными группами (Pam-полимеры).



Отщепление пептида от смолы проводится с помощью жидкого HF в присутствии анизола, раствора HF в пиридине, трифторметансульфокислоты, реактива Плесса [(CF₃COO)₃B в CF₃COOH], а так-

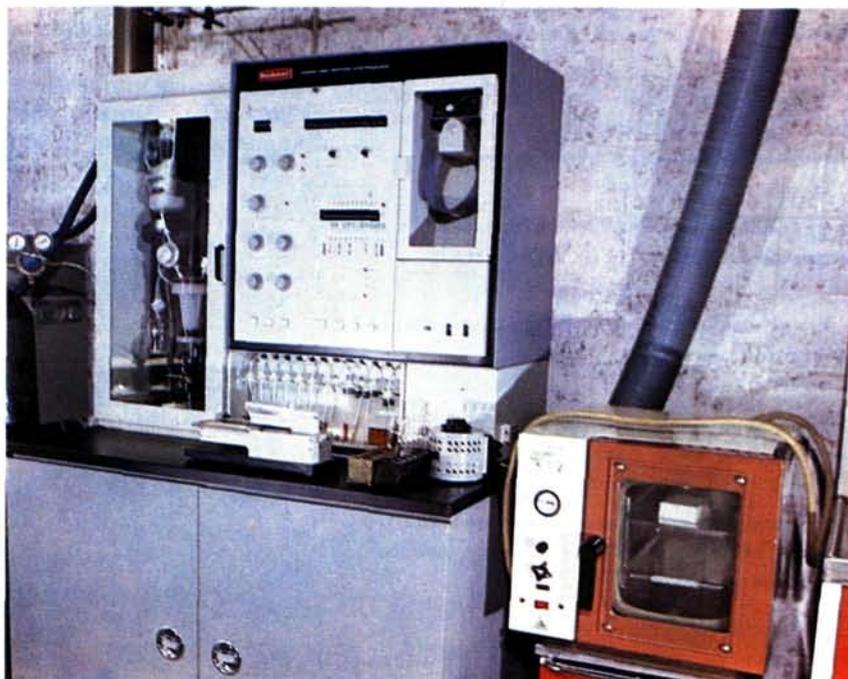


Рис. 78. Твердофазный синтезатор пептидов 990 (Beckman, США).

же $\text{HBr}/\text{CF}_3\text{COOH}$ и других реагентов; иногда применяется аммонолиз, гидраинолиз, омыление и т. п.

Автоматический твердофазный синтез пептидов осуществляется на специальных приборах, называемых синтезаторами (рис. 78).

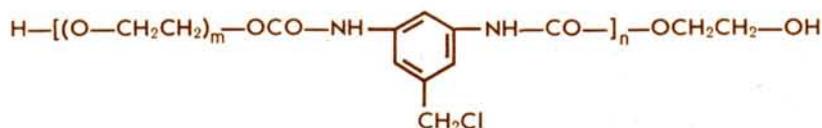
В последние годы создан колоночный вариант твердофазного синтеза пептидов. В качестве матрицы вначале использовалась полярная полиамидная смола. Этот желатинообразный полимер хорошо проницаем и сольватируется многими растворителями, включая воду и диметилформамид. Мягкие полимеры такого типа в колоночном варианте имели неудовлетворительные физико-химические и механические свойства. Р. Шеппард и сотр. предложили использовать жесткий макропористый неорганический носитель — силикагель, в порах которого заполимеризован полидиметилакриламидный гель. Этот носитель, сочетающий в себе свойства жесткой матрицы и хорошо набухающего органического геля, нашел успешное применение в колоночном твердофазном синтезе. На его основе создан и синтезатор колоночного типа.

Жидкофазный способ синтеза пептидов предусматривает использование в качестве носителей растворимых полимеров (М. М. Шемякин, 1965). Одним из недостатков твердофазного синтеза является изменение степени набухания полимера по мере роста пептидной цепи, которое может приводить к периодическому «маскированию» концевых NH_2 -групп растущей пептидной цепи. Это, в свою очередь, вызывает неполное протекание реакций конденсации на той или иной стадии, и в результате образуются «ложные пептиды», т. е. пептиды с пропуском отдельных аминокислотных остатков. Разделение смеси пептидов на конечном этапе синтеза в этом случае оказывается затруднительным. При жидкофазном способе пептидного синтеза на полимере снимаются некоторые осложнения, вызываемые гетерогенностью среды.

В качестве растворимого полимера используется полистирол (молекулярная масса около 200 000), а избыток реагентов удаляется осаждением полимера из органического раствора с последующим фильтрованием. Лучшие результаты получены при применении в качестве носителей полиэтиленгликолей с молекулярной массой 2000 — 20 000 и блок-сополимеров полиэтиленгликоля с диизоцианатами (Э. Байер, 1978).



Байер (Bayer) Эрнст (р. 1927), немецкий химик. Окончил Гейдельбергский университет (1954), с 1962 г. — профессор университета и директор Института органической химии в Тюбингене. Известен работами по структуре металлопротеинов и синтезу полипептидов на полимерных носителях.



Жидкофазный способ синтеза пептидов используется в некоторых типах автоматических синтезаторов для получения относительно небольших пептидных молекул (в случае высокомолекулярных пептидов синтез нередко осложняется из-за изменения растворимости полимера).

Завершая обсуждение методов синтеза пептидов на полимерном носителе, отметим возрастающую роль *полимерных реагентов*. В частности, часто применяются полимерные активированные эфи-

ры защищенных аминокислот типа нитрофениловых, N-гидроксисукцинимидных, 1-гидросибензотриазоловых (А. Патчорник, Т. Виланд).

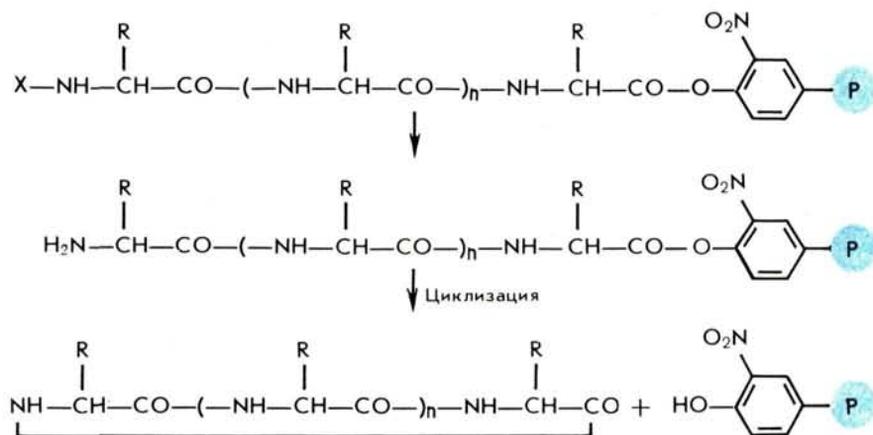
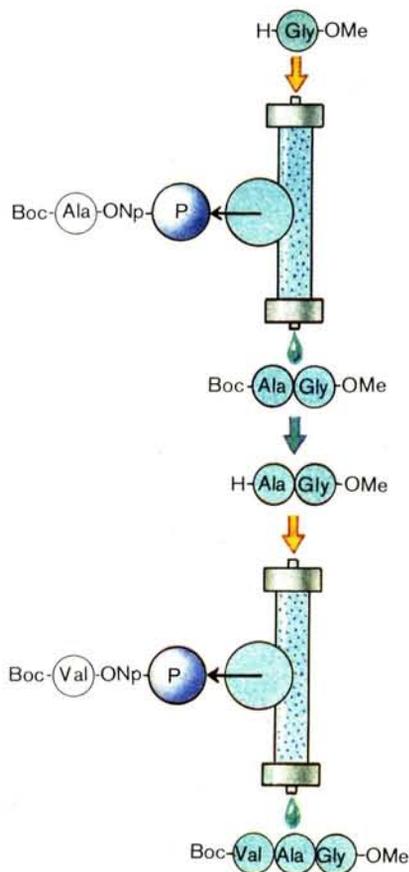
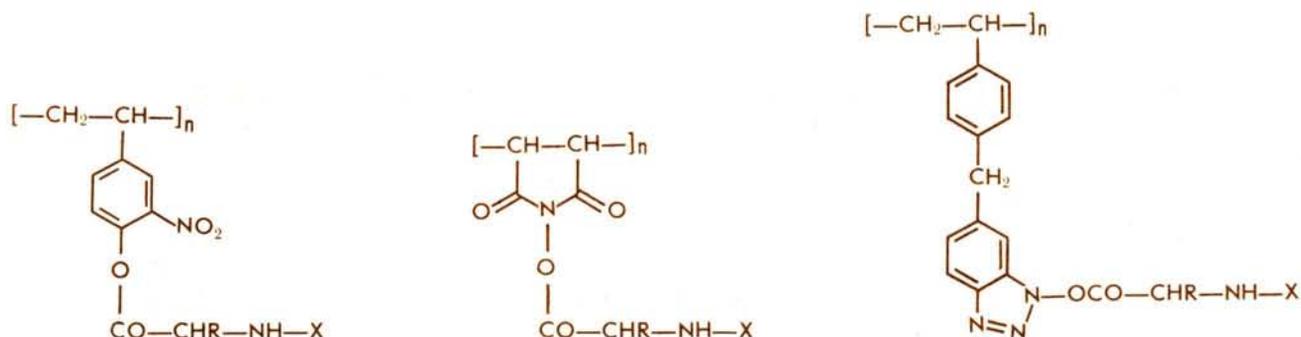
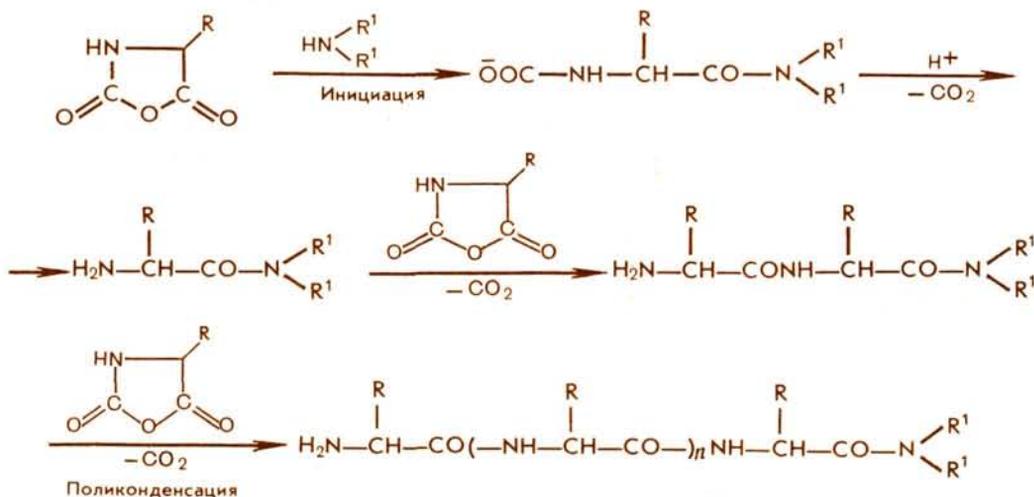


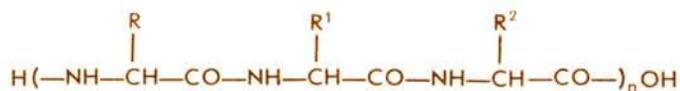
Рис. 79. Принцип синтеза пептидов с использованием полимерных активированных эфиров аминокислот.

Синтез полиаминокислот. Как уже отмечалось (с. 127), для синтеза полиаминокислот лучше всего использовать N-карбоксииан-

гидриды. Если последние являются достаточно стабильными, для ускорения реакции применяют инициаторы (спирты, амины и др.), например:

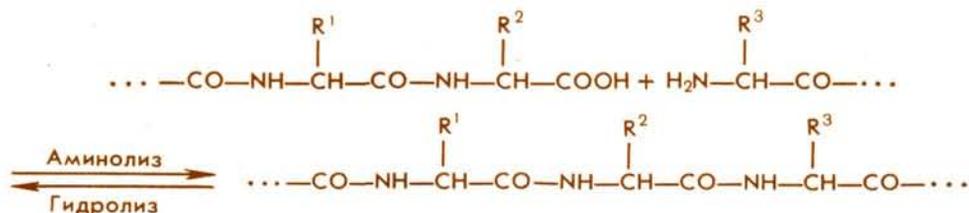


В случае смеси двух N-карбоксиянгидридов образуется сополимер аминокислот. Распределение аминокислот в цепи при этом оказывается не статистическим, а определяется природой аминокислот. На основе тех же принципов могут быть получены полимеры, состоящие из повторяющихся коротких последовательностей аминокислот. В частности, при поликонденсации с помощью различных методов линейных ди-, три-, тетра- и пентапептидов образуются соответствующие регулярные полипептиды из 30 — 50 повторяющихся единиц:



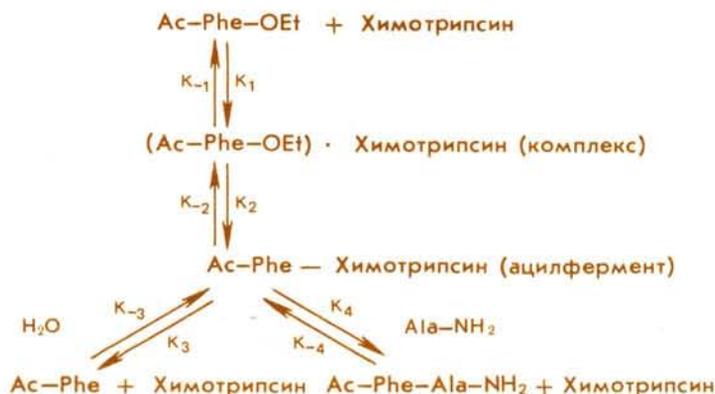
Ферментативный синтез пептидов и белков. Сложность и трудоемкость синтеза пептидов с помощью химических методов настоятельно побуждают искать принципиально иные подходы к синтезу пептидно-белковых веществ. Одним из таких подходов является синтез пептидов с использованием в качестве катализаторов ферментов. Еще в 1937 г. М. Бергманн, Г. Френкель-Конрат и Дж. Фрутон впервые сообщили о возможности обращения протеолитической реакции в сторону образования пептидной связи, однако лишь недавно были проведены первые исследования по ферментативному синтезу пептидов.

Установлено, что протеолитические ферменты — химотрипсин, папаин, термолизин и др. в специфических буферных растворах, чаще всего в водно-органических смесях, в принципе способны катализировать образование пептидных связей между аминокислотами и пептидами. Схематически катализируемую ферментами реакцию гидролиза-аминолиза можно представить следующим образом:



В водной среде равновесие такой реакции обычно сдвинуто в сторону гидролиза, однако направленное изменение условий реакции (ее термодинамических и кинетических параметров) позволяет сместить равновесие в сторону синтеза. В частности, необходимо обеспечить низкую растворимость синтезируемого пептида и/или высокую концентрацию исходных компонентов. Для этого используют соответствующие комбинации защитных групп, смешивающиеся или несмешивающиеся водно-органические смеси (такие, как ДМФА — вода, диоксан — вода, хлороформ — вода, этилацетат — вода), pH-контроль, иммобилизованные ферменты.

В качестве примера рассмотрим синтез дипептида $\text{Ac}-\text{Phe}-\text{Ala}-\text{NH}_2$ под действием химотрипсина. Известно, что химотрипсин расщепляет амидные и сложноэфирные связи, образованные карбоксильными группами ароматических аминокислот Phe, Tyr, Trp. Реакция протекает через промежуточную стадию образования ацилфермента, который далее деацилируется с участием воды как нуклеофила. В присутствии других нуклеофилов — аминокислот, их амидов и пептидов можно получить продукты как гидролиза, так и аминолиза.



Соотношение констант скоростей гидролиза (k_3) и аминолиза (k_4) определяет направление реакции и зависит от концентрации нуклеофилов. Найдено, что при pH 10,0 и 1 М концентрации $RNH_2(Ala-NH_2)$ выход пептида $Ac-Phe-Ala-NH_2$ составляет 95%.

С помощью такого подхода в настоящее время можно синтезировать небольшие пептиды. Например, при использовании в качестве катализаторов химолипазы, термолитина и папаина был получен гексапептид последовательности 6 — 11 эледиозина: $Woc-Ala-Phe-Ile-Gly-Leu-Met-NH_2$ (Х. Якубе). Преимуществами синтеза с участием ферментов являются отсутствие рацемизации, возможность работы с минимальным числом защитных группировок, высокая скорость протекания реакций. Однако не исключены побочные реакции транспептидации, гидролиза, приводящие к образованию сложных реакционных смесей.



Фрутон (Fruton) Джозеф С. (р. 1912), американский биохимик. Окончил Колумбийский университет (1934), с 1957 г. — профессор биохимии Йельского университета. Основные работы посвящены химии белков, пептидов и аминокислот, изучению специфичности и механизма действия протеолитических ферментов, истории биохимии.

Полусинтез пептидов и белков

Полусинтез (семисинтез, частичный синтез) — способ получения соединений, заключающийся в комбинировании природных пептидов и белков или их фрагментов с пептидами, полученными полным синтезом или модификацией природных объектов. Полусинтез можно рассматривать как методический прием, основанный на модификации природных соединений.

Известные в структурной химии белка способы ферментативного и химического расщепления пептидной цепи и разделение образующихся в результате фрагментов с помощью хроматографической техники позволяют получать гомогенные пептидные блоки. С помощью различных методов можно осуществить целенаправленное изменение нужного фрагмента (укорочение, удлинение, введение новых остатков и т. п.) и затем собрать из блоков новые, видоизмененные последовательности. Защитные группы при полусинтезе выбираются таким образом, чтобы их введение сохраняло способность производных растворяться в водных и водно-органических растворах. При сборке нужной последовательности из подготовленных пептидных блоков чаще всего используются такие методы, как DCC/NOBt, DCC/HOSu, а также азидный метод и метод активированных эфиров. Особое внимание уделяется при этом проблеме рацемизации.

Полусинтез как способ получения соединений пептидно-белковой природы можно проиллюстрировать на примере инсулина. В 1972 г. впервые было осуществлено превращение инсулина свиньи в инсулин человека (М. Руттенберг). Молекулы этих гормонов отличаются лишь одним аминокислотным остатком: в положении В 30 в инсулине свиньи находится Ala, а в инсулине человека — Thr. Предложенная схема (рис. 80) включала синтез гексаметилового эфира инсулина свиньи (обработкой diazometаном), расщепление В-цепи трипсином по остатку Arg-22, блокирование Woc-группой N-концевых остатков А- и В-цепей полученного «укороченного» инсулина, затем конденсацию продукта с синтетическим фрагментом В 23 — 30 инсулина человека (DCC/HOSu методом) и, наконец, удаление всех защитных групп. После интенсивной очистки удалось выделить инсулин человека с выходом около 10%.

Позднее (1980 — 1983) были предложены еще два способа ферментативного превращения инсулина свиньи в инсулин человека

(К. Морихара, Дж. Маркуссен). В 1983 г. разработан способ промышленного производства инсулина человека из инсулина свиньи, основанный на применении иммобилизованной протеиназы I из *Achromobacter lyticus* на стадиях гидролиза инсулина в дез-Ala B—30 инсулин и конденсации последнего с Thr—OBu¹ (Т. Ока).

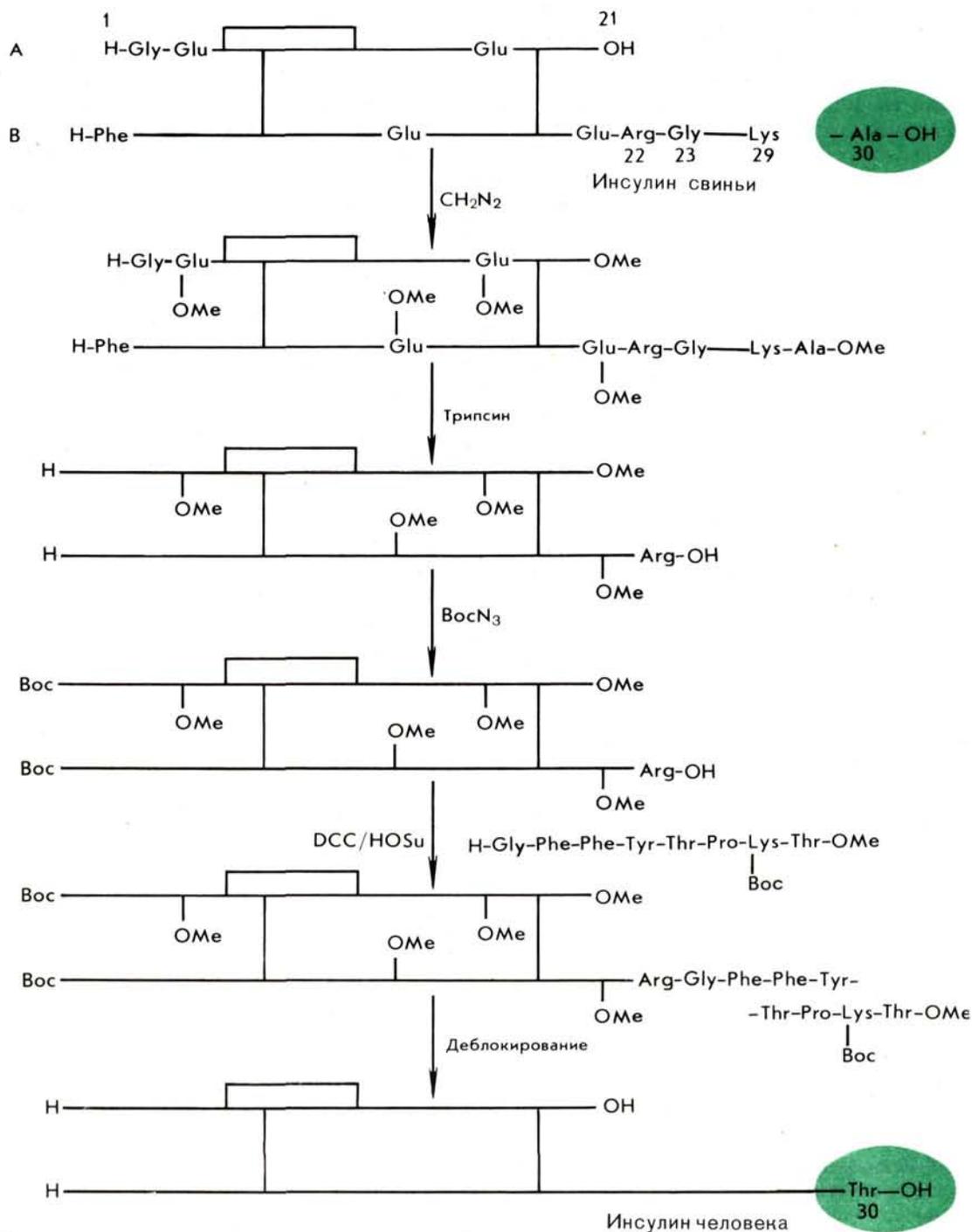
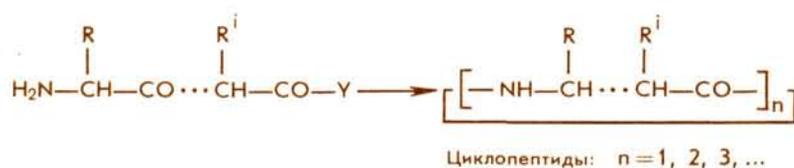


Рис. 80. Полусинтез инсулина человека из инсулина свиньи.

Для получения циклических пептидов используются обычные для пептидного синтеза методы создания амидной связи. Чаще всего первоначально создается линейный предшественник в виде защищенного пептида, активируется С-концевая карбоксильная группа, освобождается N-концевая аминогруппа и проводится реакция аминолиза собственной аминогруппой пептида. Для уменьшения межмолекулярных реакций аминолиза, приводящих к полимеризации и вследствие этого циклоолигомеризации, реакции циклизации проводят в условиях высокого разбавления в инертных растворителях. Однако, как правило, побочные реакции полимеризации всегда имеют место и уменьшают выход циклического продукта. Лучшие результаты дает метод получения циклопептидов на полимерном носителе (см. с. 148).



Выход циклических продуктов сильно зависит от стерических факторов: напряженности образующегося цикла, разветвленности боковых радикалов, термодинамических и конформационных параметров.

Синтез гетеродетных пептидов

Среди соединений пептидно-белковой природы нередко встречаются такие соединения, которые наряду с обычными амидными связями содержат и связи другого типа. Такие пептиды называются гетеродетными (гомотетные пептиды построены только из аминокислот, соединенных с помощью амидных связей). В группу гетеродетных пептидов входят: депсипептиды, в составе которых есть гидроксикислоты или гидроксиаминокислоты; S-пептиды, содержащие тиоэфирную связь между остатками; (S—S)-пептиды, содержащие дисульфидную связь; гликопептиды, содержащие N- или O-гликозидные связи, и т. д. (см. с. 472 и 474).

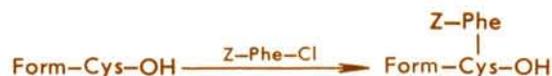
(S—S)-Пептиды. Остатки цистеина в пептидах и белках образуют дисульфидные связи, соединяющие участки одной цепи или отдельные пептидные цепи. (S—S)-Содержащие пептиды могут быть линейными и циклическими.

Создание дисульфидных связей обычно проводится на одном из последних этапов синтеза обработкой соответствующего тиольного предшественника с помощью подходящих окислителей: кислорода воздуха, иода, феррицианида калия $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$. Если в цепи имеется лишь два остатка цистеина, то при окислении SH-групп

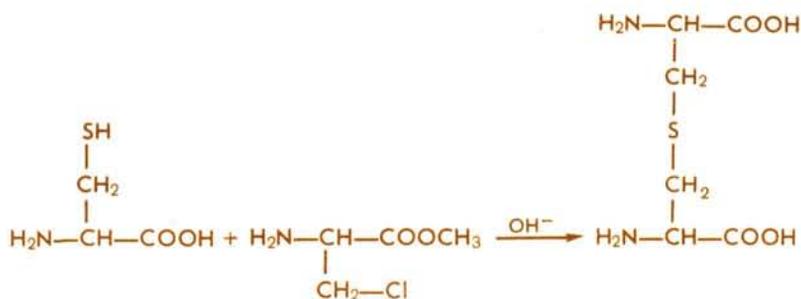
кроме циклического дисульфида получают циклические и линейные полимергомологи, степень образования которых можно уменьшить проведением процесса в условиях высокого разбавления.

Значительно более сложная ситуация возникает при синтезе соединений с несколькими дисульфидными связями. Например, если в пептиде содержится 6 остатков цистеина (3 дисульфидных связи, как в рибонуклеазе А), то формально возможно образование 105 структурных изомеров с разными дисульфидными связями. В этом случае направление и полнота реакции обычно определяются специфической укладкой пептидной цепи, что позволяет проводить самопроизвольное окислительное замыкание нужных дисульфидных связей. Естественно, здесь требуется тщательный подбор условий: окислитель, концентрация, рН среды, температура, причем даже в оптимальных условиях выход целевого продукта не высок и не исключается образование побочных соединений.

S-Пептиды. Продукты ацилирования меркаптогруппы Cys-содержащих пептидов производными аминокислот называют S-пептидами (или тиодепсипептидами). Их получают, используя различные активированные производные аминокислот (хлорангидриды, активированные эфиры и др.), например:

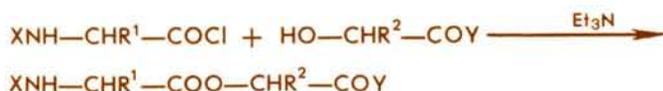


К S-пептидам относятся и пептиды, содержащие остатки лантионина или β-метиллантионина (антибиотики низин, субтилин, дурамицин, циннамицин). В. Дю Виньо и Г. Браун (1941) получили лантионин обработкой цистеина метиловым эфиром 2-амино-3-хлорпропионовой кислоты в щелочной среде:

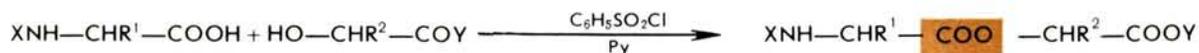


Депсипептиды. Депсипептиды составляют большую группу природных соединений, содержащих остатки гидроксикислот (в том числе и гидроксиаминокислот), связанных с другими остатками в цепи не только амидными, но и сложноэфирными связями. Особенность синтеза депсипептидов состоит в создании сложноэфирной связи. Для ацилирования малореакционноспособных вторичных

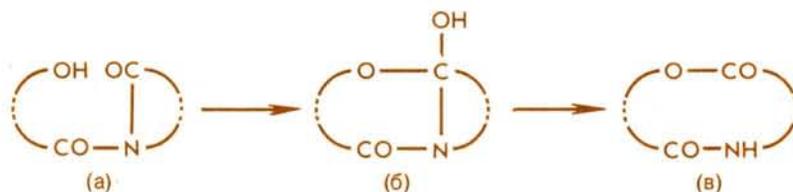
гидроксигрупп пригодны лишь методы с сильной активацией карбоксильного производного — хлорангидридный, дициклогексилкарбодиимидный, смешанных ангидридов, имидазолидный.



В синтезах природных депсипептидов для создания сложноэфирной связи широко использовались смешанные ангидриды производных аминокислот, полученные при действии бензолсульфохлорида в пиридине (Дж. Плесс, 1961):

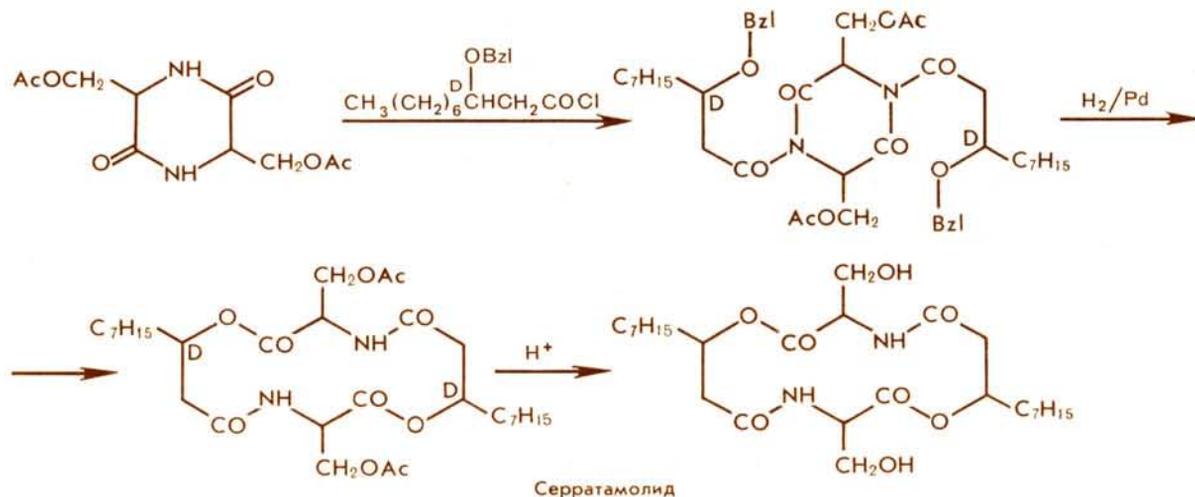


Стратегия синтеза депсипептидов предусматривает, как правило, сначала создание сложноэфирных связей, а затем соединение полученных блоков путем образования амидных связей. Такой подход более рационален, особенно при получении регулярных депсипептидов, так как для создания амидных связей можно использовать практически любой из обычных методов пептидного синтеза. Часто для этих целей применяется высокоэффективный хлорангидридный метод, причем при соблюдении соответствующих условий удастся избежать рацемизации. С помощью указанных методов синтезированы депсипептидные антибиотики — валиномицин, энниатины и множество их аналогов (М. М. Шемякин, Ю. А. Овчинников с сотр., 1962 — 1977).



Принципиально другой метод синтеза депсипептидов основан на реакции гидроксиацильного включения (а → в) в амиды, ацилированные остатками гидроксикислот (а), которая протекает через промежуточные циклолы (б) (М. М. Шемякин, В. К. Антонов с сотр., 1963).

С помощью этой реакции были синтезированы в три стадии антибиотик серратамолид и ряд его аналогов с модифицированными боковыми цепями. О,О-Диацетилованный 2,5-дикетопиперазин серина был N-ацелирован хлорангидридом О-бензил-3-гидроксидекановой кислоты, подвергнут гидрированию и далее продукт перегруппировки кислотным гидролизом превращен в серратамолид.



По энергетическим причинам реакция гидроксиацильного включения легко проходит лишь в случае, если образующийся цикл содержит 10 или более атомов в кольце.

Примеры синтеза пептидов и белков

Классическим и твердофазным методами синтезировано большое число пептидов, в том числе природных.

Первым синтезом пептидного гормона был синтез окситоцина, осуществленный В. Дю Виньо с сотр. в 1953 г. Синтез проведен блочной конденсацией по схеме 2 + 7 (3 + 4). С-Концевой трипептид (7—9) Z-Pro—Leu—Gly—OEt (рис. 81) получался методом смешанных ангидридов и после удаления Z-группы гидрированием конденсировался с дихлорангидридом дикарбобензоксистицина. Образовавшийся симметричный бис-тетрапептид (6—9) после омыления эфира и обработки Na/NH₃ для удаления Z-группы S-бензилировался и переводился в соответствующий бензиловый эфир. Последний подвергался аммонолизу, в результате чего получался исходный С-концевой блок H—Cys(Bzl)—Pro—Leu—Gly—NH₂. Для синтеза следующего фрагмента хлорангидрид Tos-пироглутаминовой кислоты конденсировался с аспарагином, после удаления Tos-группы с помощью Na/NH₃ свободный пептид

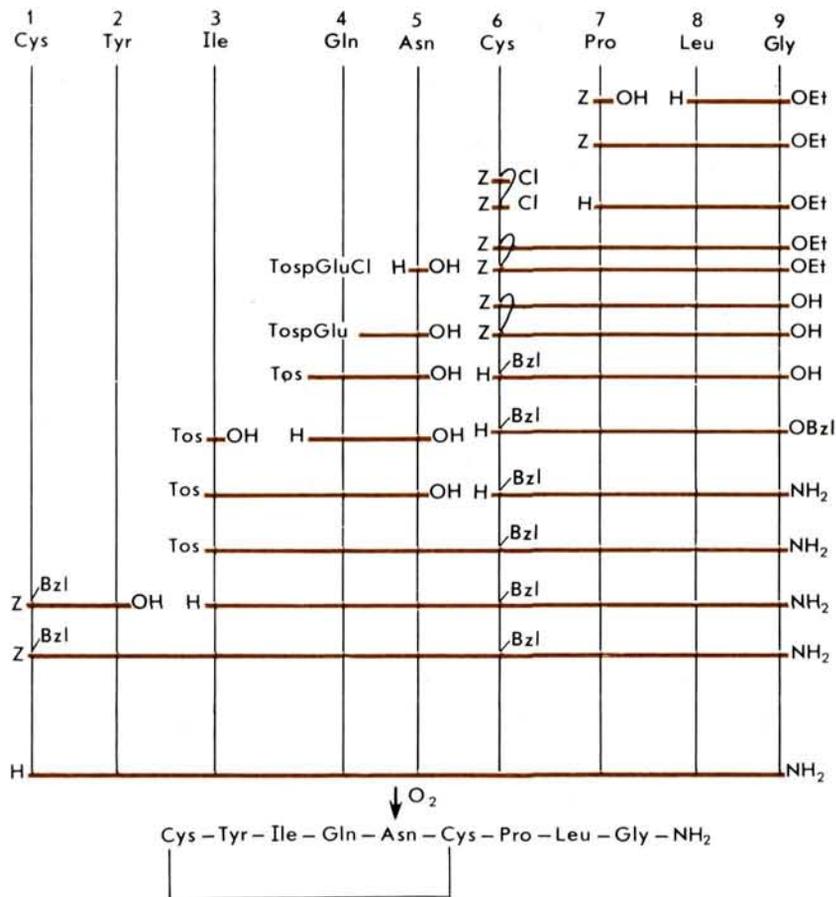
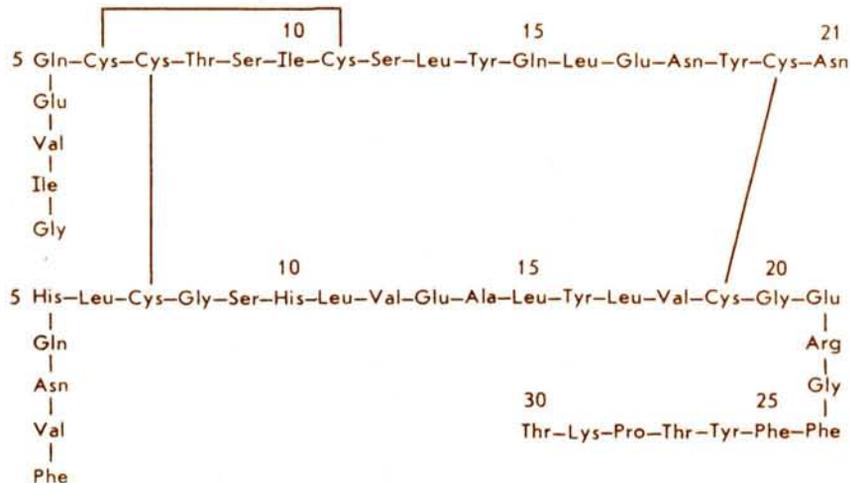
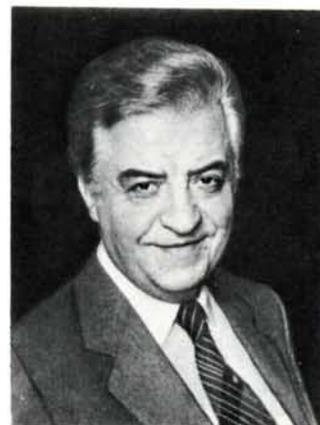


Рис. 81. Схема синтеза окситоцина по В. Дю Виньо.



Инсулин человека



Катсояннис (Katsoyannis) Панайотис (р. 1924), американский биохимик. Образование получил в Афинском университете, с 1952 г. работал в Корнеллском университете, затем в Брукхевенском центре медицинских исследований и Нью-Йоркском университете. Известный специалист в области синтеза пептидов. Осуществил (1964) один из первых полных синтезов инсулина.

представлялся реальной задачей. В начале 60-х годов одновременно в двух лабораториях — П. Катсоянниса (США) и Х. Цана (ФРГ) начались работы по синтезу цепей инсулина. Группа Х. Цана синтезировала фрагменты 1 — 9, 10 — 21 цепи А и фрагменты 1 — 8, 9 — 14, 15 — 20 и 21 — 30 цепи В, а П. Катсояннис получил такие же фрагменты цепи А и несколько другие для цепи В: 1 — 9, 10 — 13, 14 — 20, 21 — 30. Фрагменты были соединены в цепи А и В, освобождены от защитных групп и переведены в S-сульфонаты. Окисление смесей S-сульфонатов цепей привело к продуктам, обладающим активностью инсулина. Кристаллический образец чистого синтетического инсулина быка впервые получен китайскими химиками в 1965 г. в результате синтеза, проведенного по сходной схеме (Я. Кунг) (см. с. 157).

Синтезы инсулина, осуществленные тремя группами — П. Катсоянниса в США, Я. Кунга в КНР и Х. Цана в ФРГ в 1963 — 1965 гг., сыграли значительную роль в совершенствовании методологии синтетической пептидной химии.

Следующей вехой в развитии синтетических исследований был синтез S-белка рибонуклеазы А, предпринятый в США под руководством Р. Хиршмана (1963 — 1969). Стратегия синтеза (рис. 82) отличалась от применявшихся ранее подходов тем, что авторы стремились использовать минимальное число защитных группировок и упростить стадии конечного деблокирования. В ходе синтеза был предложен способ удлинения пептидной цепи N-карбоксиингидридами аминокислот (см. с. 143) и введена в практику ацетамидометильная группа для SH-функции. В итоге шестилетнего труда Р. Хиршман и сотр. получили продукт, обладающий в присутствии S-пептида 30% активности рибонуклеазы А и рядом ее физико-химических показателей.

Среди классических синтезов простейших белков необходимо отметить синтез рибонуклеазы А, состоящей из 124 аминокислотных остатков (Х. Яджима, 1980), и синтез нейротоксина II (61 остаток) из яда среднеазиатской кобры *Naja naja oxiana* (В. Т. Иванов и сотр., 1982).

Синтез рибонуклеазы А (Б. Гутте, Р. Меррифилд, 1969 — 1971) и β-липотропина, содержащего 91 аминокислотный остаток (Ч. Ли, Д. Ямаширо, 1978), был осуществлен твердофазным методом.

Химическая модификация белков и пептидов

Задачи химической модификации белково-пептидных веществ, как правило, связаны с выяснением связи между их структурой и биологической функцией. Естественно, при этом могут преследоваться и другие цели, например создание практически важных препаратов с заданными свойствами.

В зависимости от решаемых задач и применяемых методов принято различать следующие типы химической модификации белков и пептидов.

Замена одного или нескольких аминокислотных остатков на другие и получение на этой основе разнообразных аналогов природных соединений. Такая модификация пептидов достигается



Цан [Zahn] Хельмут (р. 1916), немецкий химик-органик, иностранный член АН СССР (1982). Окончил Высшую техническую школу в Карлсруэ (1940), работает в Институте исследования шерсти при Техническом университете в Аахене (ФРГ). Известен работами в области химии натуральных и синтетических волокон, один из ведущих специалистов по химии пептидов. Впервые синтезировал инсулин (1963).

методами пептидного синтеза (см. с. 151), а белков — посредством так называемого «направленного мутагенеза» (см. с. 379).

Модификация отдельных аминокислотных остатков с помощью селективных химических реагентов. Специфичность реакции определяется природой боковой цепи аминокислотного остатка, пространственным строением модифицируемого соединения и условиями реакции.

Модификация с помощью бифункциональных реагентов, взаимодействующих одновременно с двумя или более функциональными группами белков.

Направленная биоспецифическая модификация по «точному адресу», так называемое «аффинное мечение». Широко известно, например, применение субстратоподобных агентов для химического исследования природы и локализации активного центра ферментов или иных систем. Как биоспецифическую модификацию можно рассматривать и некоторые процессы модификации белков, такие, как фосфорилирование, ацилирование, гликозилирование, метилирование, протекающие в клетке с участием соответствующих ферментов.

Введение различных химических меток, репортерных групп, расширяющих возможности физико-химических методов (ЯМР- и ЭПР-спектроскопия, масс-спектрометрия, рентгеноструктурный анализ и др.) при исследовании структуры и функции белков (см. с. 111).

Ковалентное присоединение белка или пептида к полимеру с целью получения так называемых «иммобилизованных» препаратов (например, иммобилизованных ферментов) или создания высоко-селективных носителей для биоспецифической (аффинной) хроматографии.

Топохимическая модификация (трансформация) пептидных систем, используемая при конструировании биологически активных аналогов природных соединений.

Ниже более подробно рассматриваются некоторые из перечисленных типов химической модификации.

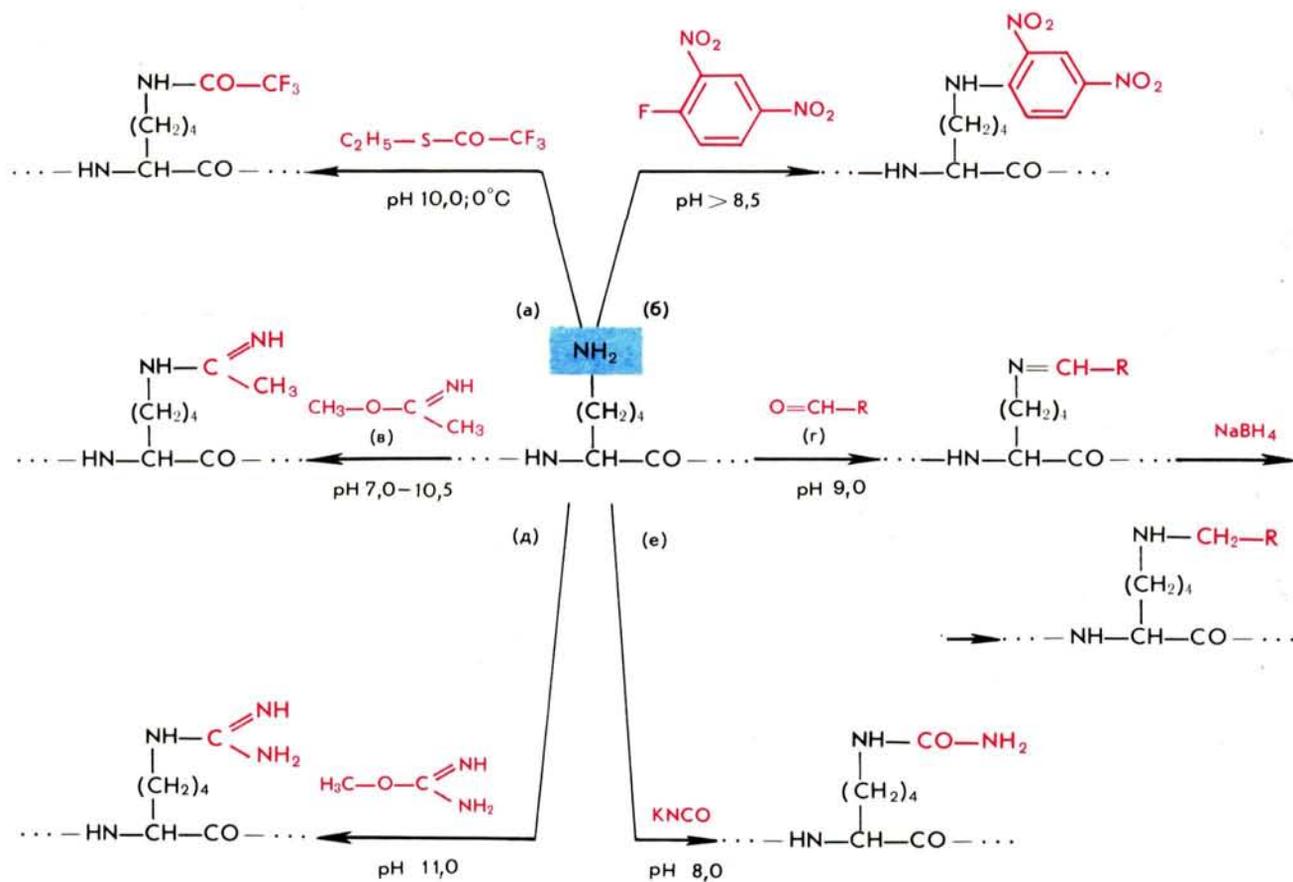
Селективная модификация аминокислотных остатков

Белок является полифункциональным соединением, в котором каждый аминокислотный остаток выполняет определенную роль в поддержании нативной конформации или проявлении биологической функции. Если используются модифицирующие агенты достаточно широкой специфичности, конечный результат зависит от доступности тех или иных функциональных групп белка в данных условиях. В частности, ацилирование с помощью радиоактивно меченного уксусного ангидрида было предложено в качестве метода локализации остатков лизина, расположенных на поверхности белковой глобулы (Б. Хартли). Этот прием широко применяется и для исследования топографии мембранных белков, когда доступными действием так называемых непроникающих реагентов оказываются лишь группировки, расположенные вне мембраны.

В настоящее время известно значительное число специфических реагентов, селективно модифицирующих боковые цепи аминокислот. Большинство из приведенных ниже реакций применяется для выявления функционально важных аминокислотных остатков. Многие

из них используются также при исследовании структуры белков и пептидов.

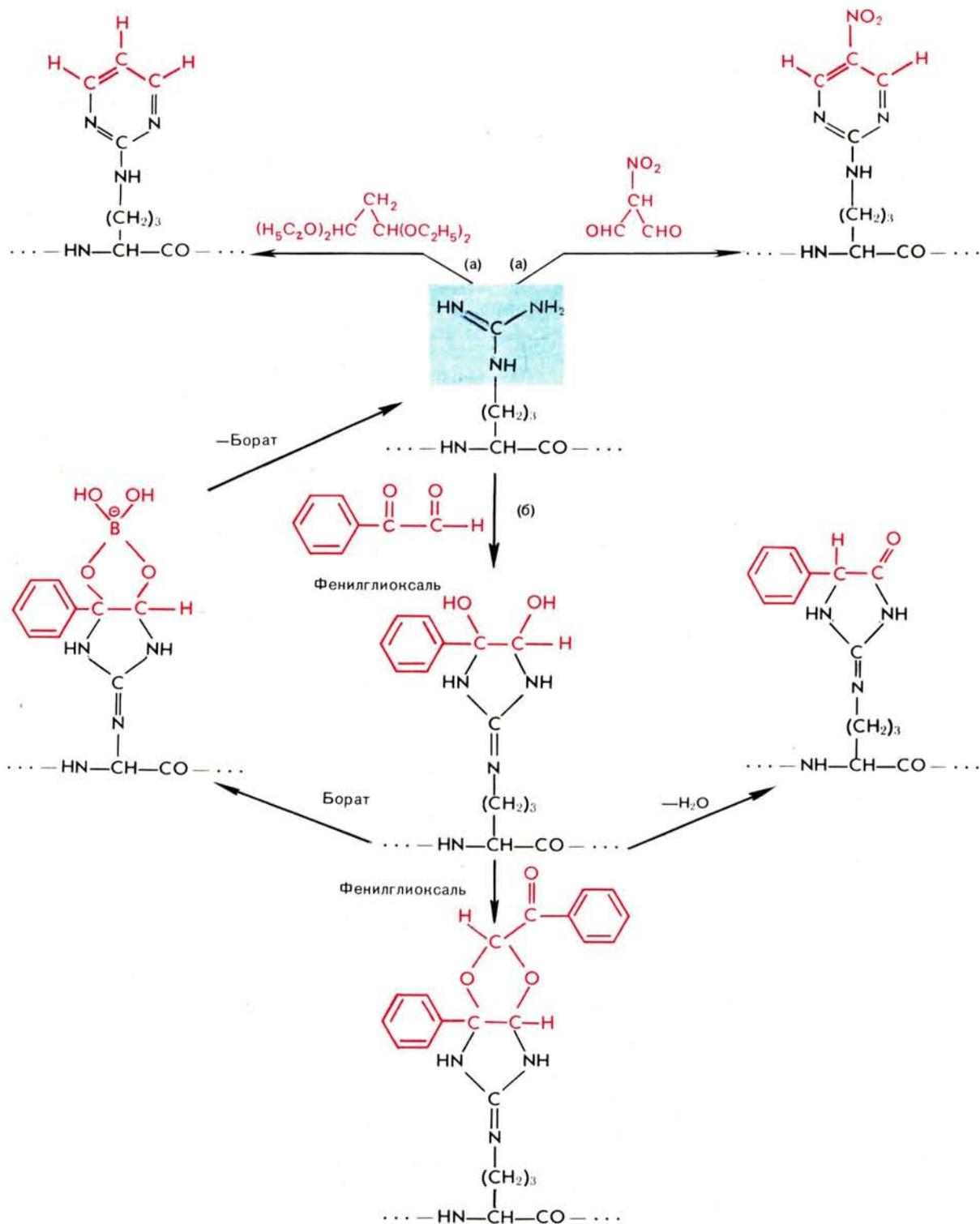
Лизин. ϵ -Аминогруппы остатков лизина являются весьма удобными мишенями для модификации. Наибольшее распространение при этом получили следующие методы: а) ацилирование с помощью уксусного, трифторуксусного или янтарного ангидридов, S-этилтрифторацетата; иногда применяется обратимое ацилирование малеиновым или цитраконовым ангидридами (см. с. 43); б) арилирование; в) реакция с имидоэфиром; г) образование шиффо-



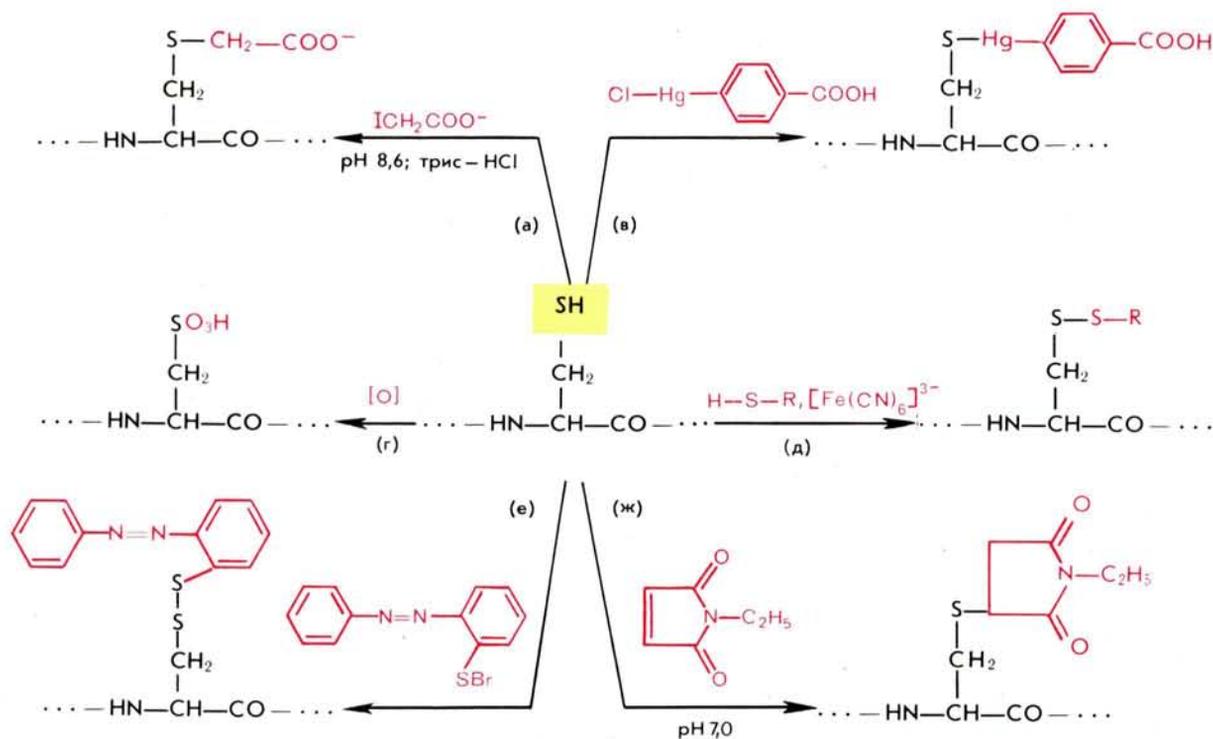
вых оснований с последующим восстановлением боргидридом натрия; д) гуанидирование (до производных гомоаргинина); е) карбамоилирование, а также дансилирование. Последняя реакция широко используется при анализе первичной структуры белков и пептидов (см. с. 37), а также для введения флуоресцентной метки в белки. Все перечисленные реакции могут применяться и для модификации N-концевой аминогруппы белков и пептидов.

Аргинин. Для модификации гуанидиногруппы остатков аргинина используются гидролиз до производных орнитина (см. с. 65) и конденсация с 1,2-дикетонами (например, 1,2-циклогександио-

ном), позволяющая обратимо модифицировать остатки аргинина (см. с. 44), а также указанные на схеме реакция с 1,3-дикарбонильными соединениями и их производными (нитромалоновый альдегид, тетраэтоксипропан) (а) и реакция с фенилглиоксалем (б).

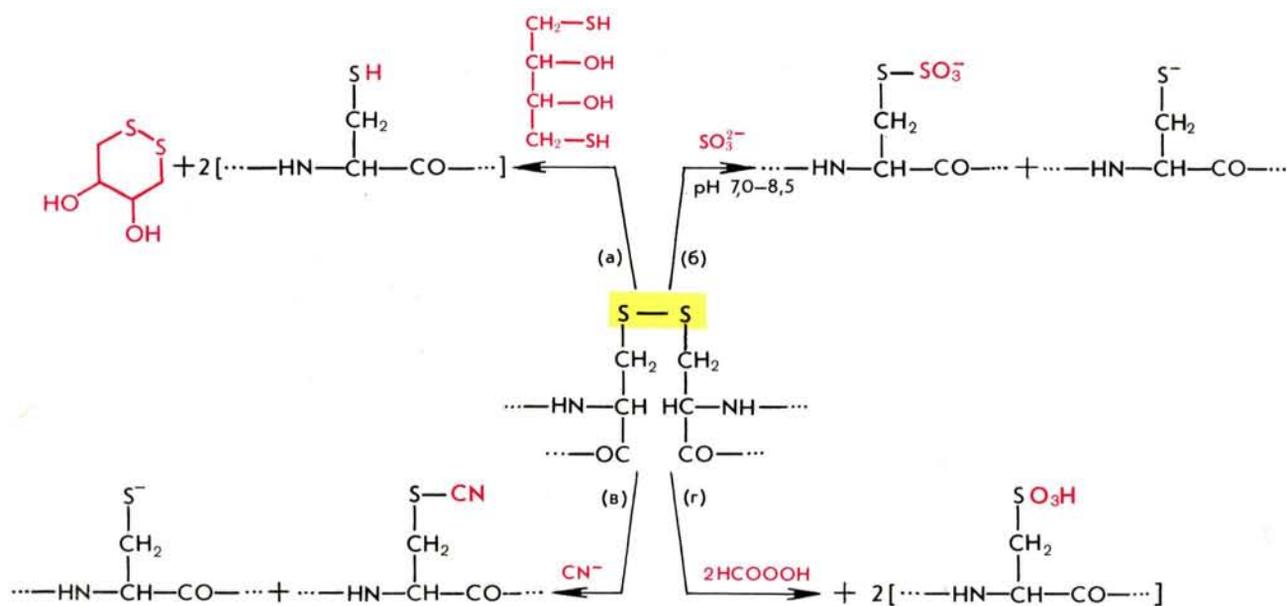


Цистеин. Сульфгидрильная группа остатка цистеина является одной из наиболее реакционноспособных в белках, и она особенно часто подвергается химической модификации. Для этой цели применяются: а) алкилирование иодуксусной кислотой или иодацета-



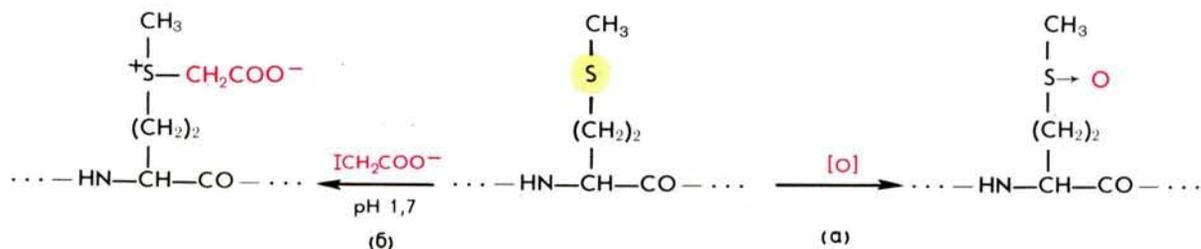
мидом (используется для защиты сульфгидрильных групп от окисления в ходе структурного изучения белков и пептидов); б) аминоэтилирование с помощью этиленimina (азиридина) (см. с. 44); в) реакция с *p*-хлормеркуриобензойной кислотой (П. Д. Бойер, 1954) (часто применяется для количественного определения SH-групп в белках и пептидах); г) окисление с помощью O_2 , H_2O_2 или надмуравьиной кислоты до производных цистеиновой кислоты (В. Хирш, 1956), одновременно могут подвергаться окислению остатки Trp (в формилкинуренин) и Met (в сульфоксид и сульфон); д) окисление в мягких условиях с образованием меж- или внутримолекулярных дисульфидных связей под действием иода, феррицианида $[Fe(CN)_6]^{3-}$, *o*-иодозобензойной кислоты, H_2O_2 ; е) реагенты, приводящие к получению несимметричных дисульфидов, в частности реагент Элмана, применяемый для количественного определения сульфгидрильных групп в белках (см. с. 75), и азобензол-2-сульфенилбромид (А. Фонтана, 1968); ж) конденсация с *N*-этилмалеимидом, модификации могут подвергаться также остатки His и Lys, но при pH 7,0 скорость реакции с SH-группой в 10^3 раз выше.

Цистин. Для модификации дисульфидных групп остатков цистина в основном применяются: а) восстановление тиолами, наиболее широко используется дитиотреитол (ДТТ — реактив Кле-ланда, 1964); образование циклического дисульфида при реакции с ДТТ термодинамически выгодно, скорость аналогичной реакции с β -меркаптоэтанолом в 10^4 раз ниже; б) окислительный сульфитолиз, реакция протекает в присутствии окисляющих агентов (O_2 , иодозобензойная кислота и т. п.) и катализируется цистеином или β -меркаптоэтиламино; в) расщепление цианидами (Р. Вуд, 1963), реакция обычно сопровождается циклизацией тиоцианопроизводных в ацилиминотазолидины (см. с. 52); г) окисление надмуравьиной кислотой (С. Энгер, 1949).



Метионин. Для модификации остатков метионина применяются: а) окисление H_2O_2 , надмуравьиной кислотой или фотоокисление (в присутствии метиленового синего) до сульфона; б) алкилирование иодуксусной кислотой, иодацетамидом или β -пропиолактоном с образованием сульфониевых солей.

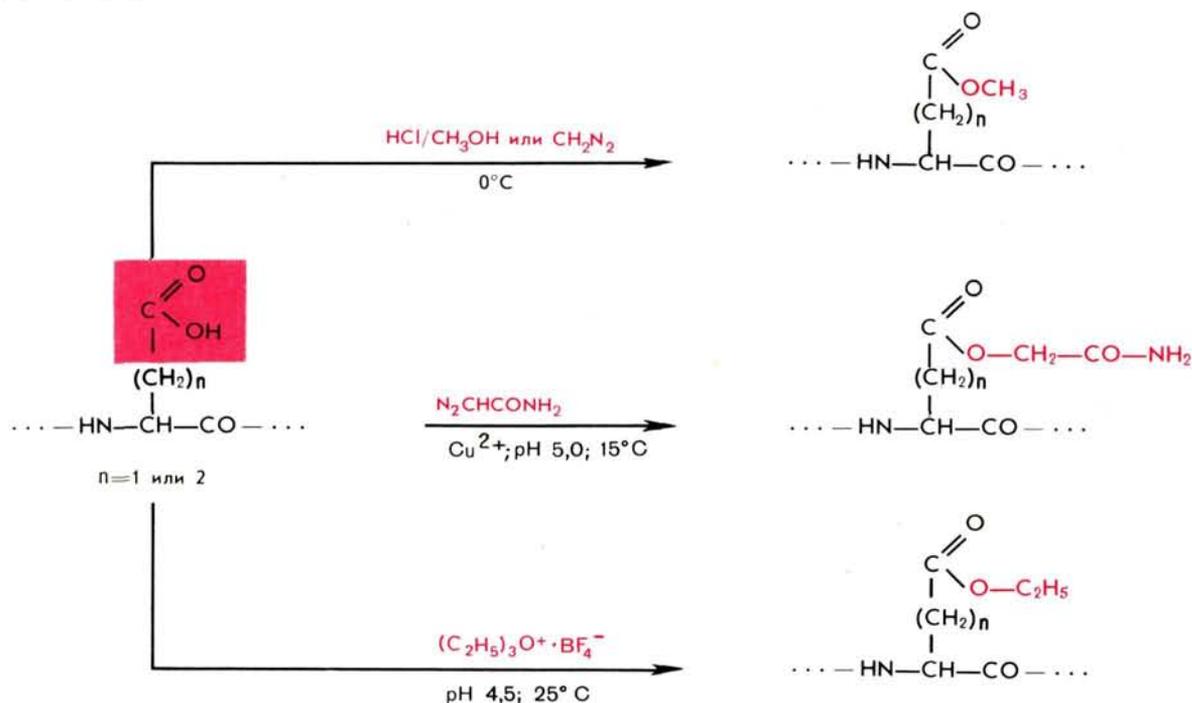
Деградация сульфониевых солей метионина в пептидах при кипячении в воде сопровождается расщеплением связи, образова-



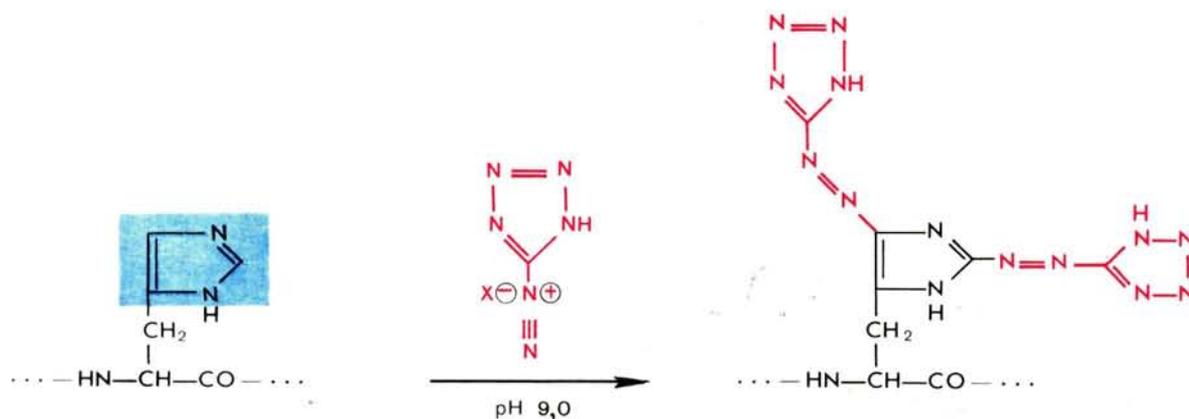
ной карбоксильной группой метионина (аналогично тому, как это происходит при действии бромциана, см. с. 48). Наилучший выход (50%) достигается при алкилировании иодацетамидом.

При действии на сульфониевые производные β -меркаптоэтанола происходит количественная регенерация метионина.

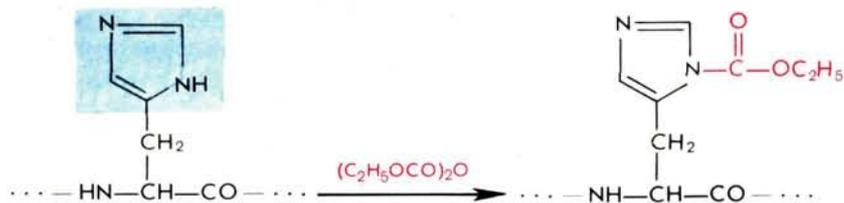
Аспарагиновая и глутаминовая кислоты. Карбоксильные группы остатков глутаминовой и аспарагиновой кислот обычно модифицируют путем превращения их в сложные эфиры (реакция этерификации) или продукты взаимодействия с водорастворимыми карбодиимидами (см. с. 131). Для этерификации используются: раствор хлористого водорода в метаноле, диазометан, диазоацетамид или борфторид триэтилоксония.



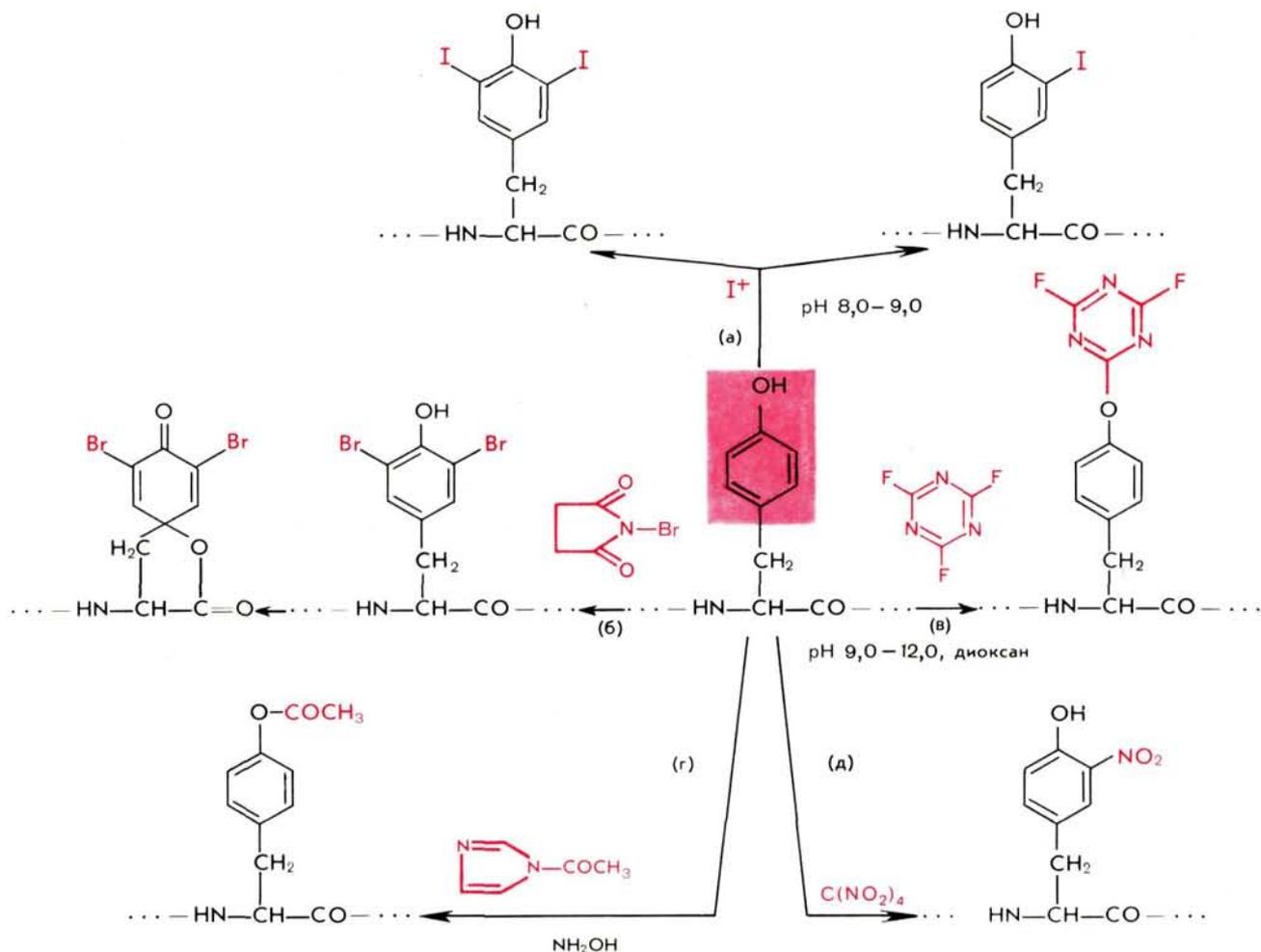
Гистидин. Имидазольное кольцо гистидина реагирует с 1-фтор-2,4-динитробензолом и α -галогенкислотами, но эти реакции мало-селективны. Лучшие результаты дает диазотирование с помощью диазотетразола.



Для модификации остатков гистидина в белках, особенно в активных центрах ферментов, ранее широко применялось сенсibilизированное красителями фотоокисление (В. Рей, 1967). В последнее же время предпочитают использовать диэтилпирокарбонат, который при pH 5,5 — 7,5 достаточно специфично реагирует с остатками гистидина.

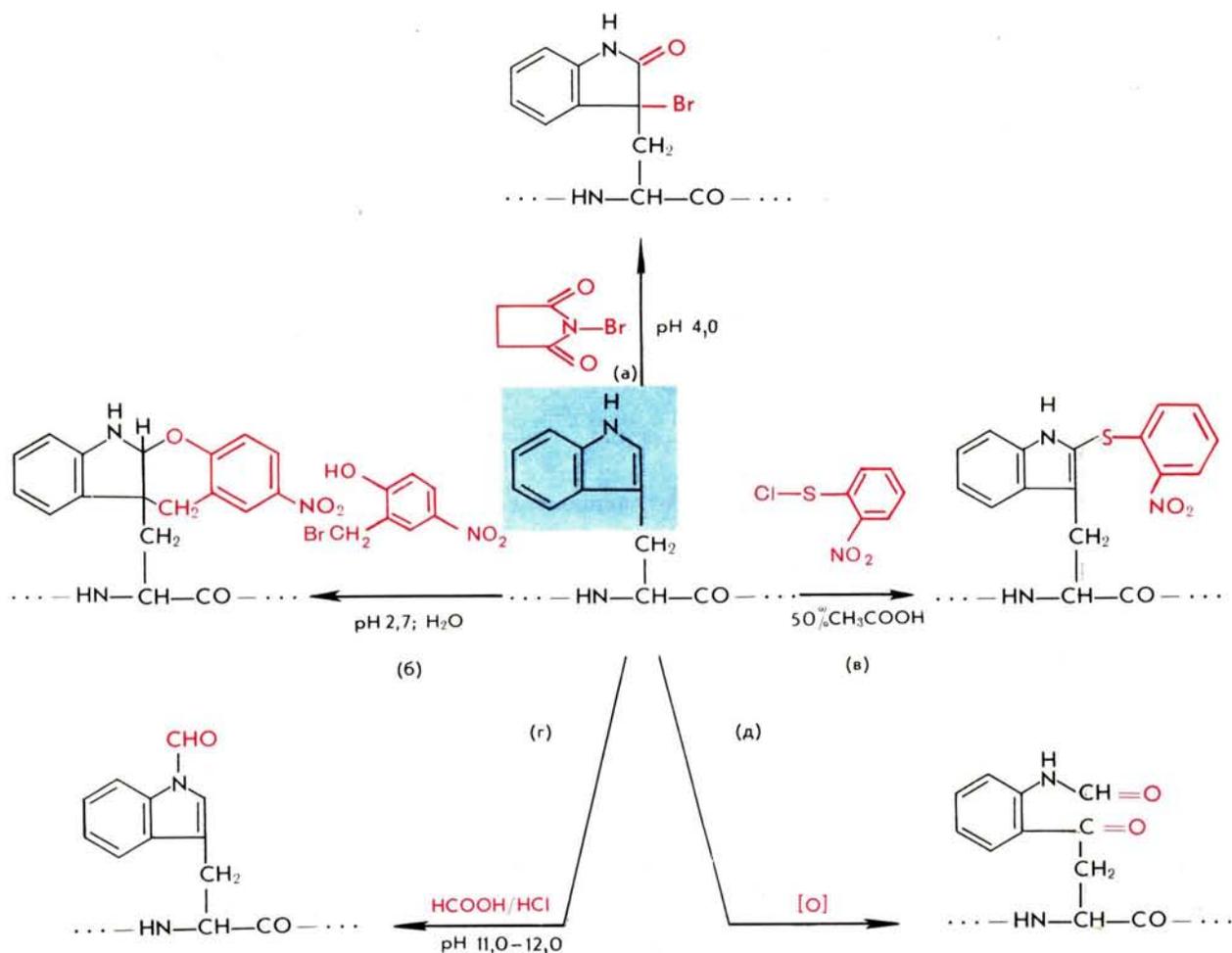


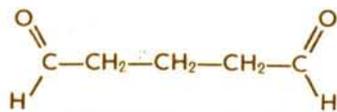
Тирозин. Остатки тирозина модифицируются достаточно легко и селективно. Для этого широко используются: а) иодирование, особенно с помощью радиоактивных изотопов ^{125}I и ^{131}I , в частности иодирование применяется для введения тяжелого атома при рентге-



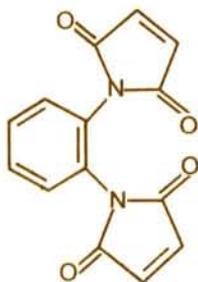
ноструктурных исследованиях; для электрофильного замещения протона ароматического кольца тирозина нужен катион I^+ , получаемый в реакционной смеси из иодид-аниона под действием химического окислителя — N-хлортолуолсульфамида натрия (хлорамины Т) или ферментной окислительной системы (лактопероксидаза, H_2O_2) (М. Моррисон, 1968); б) окислительное бромирование с помощью N-бромсукцинимидом; вначале образуется дибромпроизводное, а дальнейшее окисление приводит к разрыву пептидной связи и образованию дибромдиенон-спиролактона; г) реакция с цианурфторидом, позволяющая спектрофотометрически определять количество доступных остатков тирозина; д) ацелирование N-ацелимидазолом; е) нитрование с помощью тетранитрометана. Побочной реакцией в последнем случае может быть внутри- и межмолекулярная «сшивка».

Триптофан. а) Для модификации остатков триптофана используется реакция с N-бромсукцинимидом (Б. Виткоп, 1970); реакция может останавливаться на стадии бромпроизводного или приводить далее к расщеплению пептидной связи, образуемой карбоксильной группой остатка триптофана. В последнее время для этих целей более эффективно используется BNPS-скатол (см. с. 50). Среди других методов модификации остатка триптофана следует отметить: б) алкилирование 2-гидрокси-5-нитробензилбромидом (Д. Кошланд, 1964); в) реакция с 2-нитрофенилсульфенилхлоридом





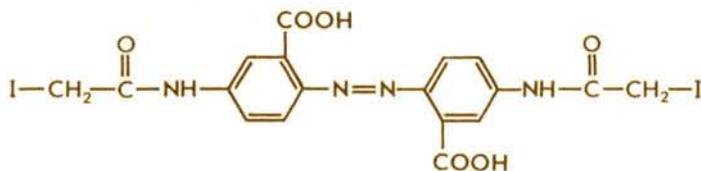
Глутаровый альдегид

N,N'-(1,2-Фенилен)-
бис-малеимид

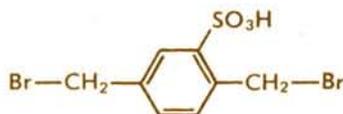
(Э. Скофоне, 1972); г) формилирование безводной муравьиной кислотой, насыщенной газообразным HCl; д) фотоокисление (98%-ная HCOOH в присутствии профлавина) или озонлиз (100%-ная HCOOH, резорцин).

Бифункциональные реагенты. К бифункциональным реагентам относят химические соединения, содержащие две (обычно одинаковые) пространственно разделенные реакционноспособные группировки. Бифункциональные реагенты широко используются для ковалентной «сшивки» пространственно сближенных участков как одной белковой молекулы, так и двух разных белков, функционирующих в едином комплексе. С помощью таких реагентов изучают третичную и четвертичную структуры белков и выясняют области контактов различных белковых молекул между собой или с другими биополимерами. К бифункциональным реагентам относятся, например, глутаровый альдегид, взаимодействующий с аминогруппами, и N-замещенные производные малеимида, реагирующие с сульфгидрильными группами белков.

Менее специфичны алкилгалогениды, способные модифицировать амино-, сульфгидрильную, а также имидазольную группы, и арилгалогениды, реагирующие, кроме того, и с фенольным гидроксидом.

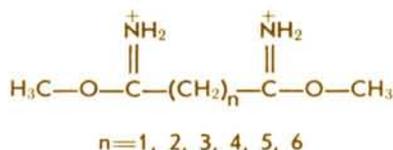


2,2'-Дикарбокси-4,4'-ди(иодацетиамидо)азобензол

 α,α' -Дибром-*p*-ксилолсульфоуксусная кислота

1,5-Дифтор-2,4-динитробензол

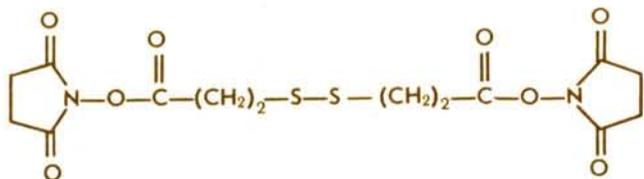
Широкое распространение в качестве бифункциональных реагентов находят диимидоэфир, модифицирующие аминогруппы белков:



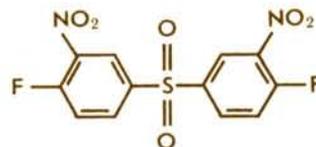
Особую группу составляют реагенты, содержащие дисульфидные связи или другие группировки (эфирные, азо-, сульфоновые), расщепляемые в достаточно мягких условиях (расщепляемые бифункциональные реагенты).

Использование расщепляемых реагентов облегчает процесс идентификации «сшиваемых» с их помощью белков при исследовании топографии многокомпонентных белковых систем.

Синтез
и химическая модификация
белков и пептидов



Бис-сукцинимидный эфир 3,3'-дитио-бис(пропионовой кислоты)

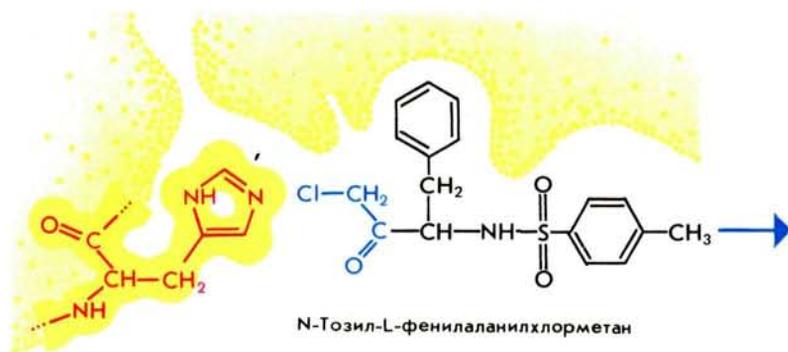


p,p'-Дифтор-м,м'-динитрофенилсульфон

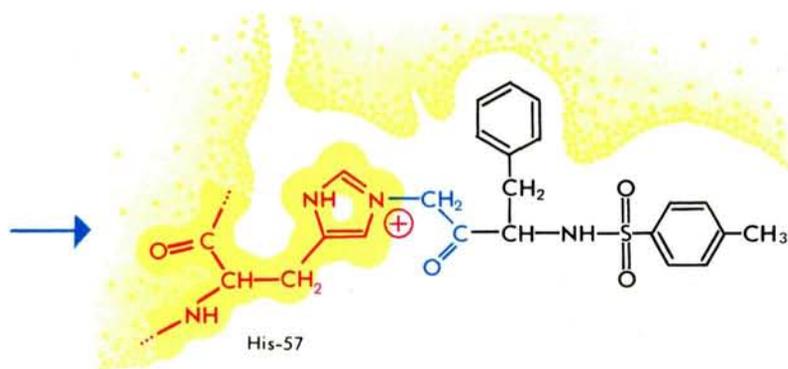
Биоспецифическая модификация белков

Реакционноспособные аналоги субстратов или других биоспецифических лигандов (гормонов, медиаторов и т. п.) могут преимущественно или даже исключительно взаимодействовать с аминокислотными остатками, расположенными в активном центре фермента или белка-рецептора. В общем случае такие реагенты называются субстратоподобными.

Химотрипсин



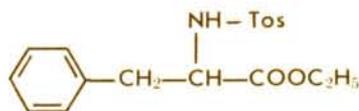
Химотрипсин



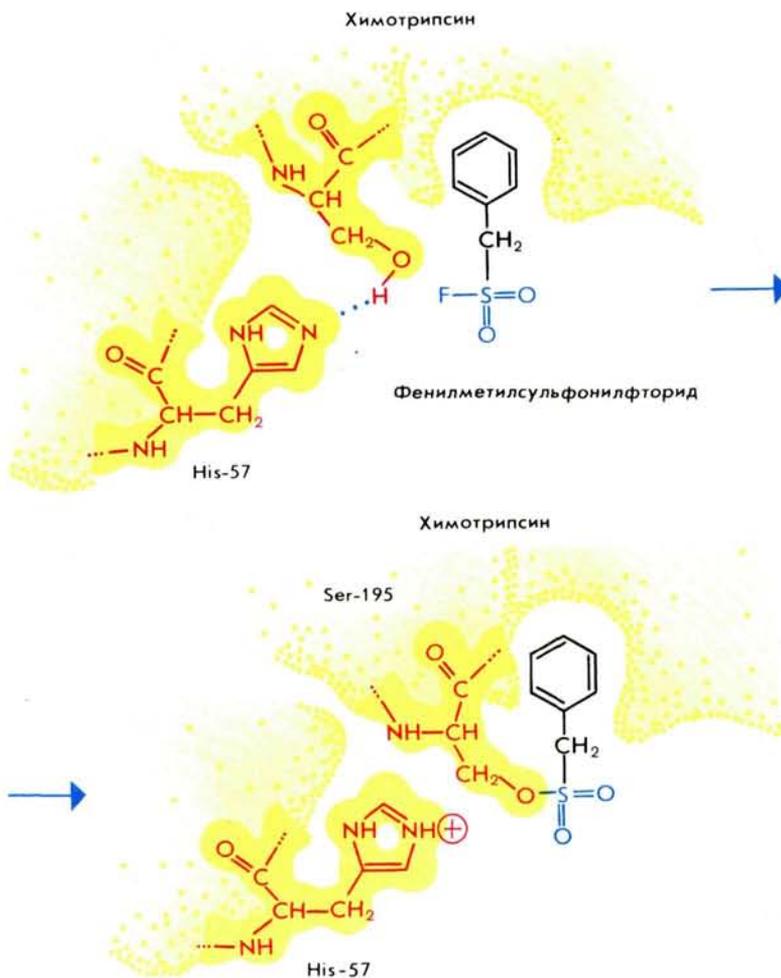


Кошланд (Koshland) Дэниел Е. (р. 1920), американский химик-биоорганик. Окончил Калифорнийский университет в Беркли (1941), с 1965 г.— профессор того же университета. Внес значительный вклад в химию белков и изучение механизма действия ферментов. Исследовал молекулярные механизмы поведенческих реакций.

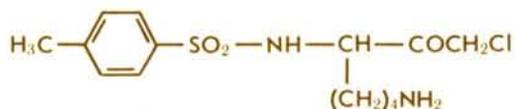
Так, например, этиловый эфир N-тозил-L-фенилаланина является субстратом химотрипсина:



Аналог этого соединения — N-тозил-L-фенилаланилхлорметан был предложен в 1963 г. Е. Шоу в качестве специфического ингибитора. Оказалось, что этот реагент селективно алкилирует остаток гистидина (His-57), расположенный в активном центре химотрипсина.

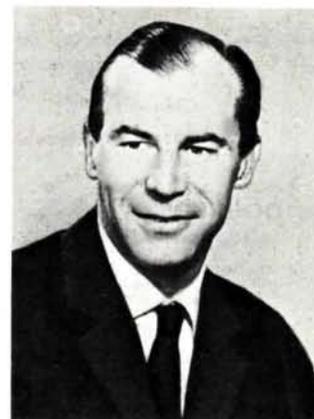


Активным ингибитором трипсина является аналогичный по структуре хлорметилкетон—N-тозил-L-лизилхлорметан:

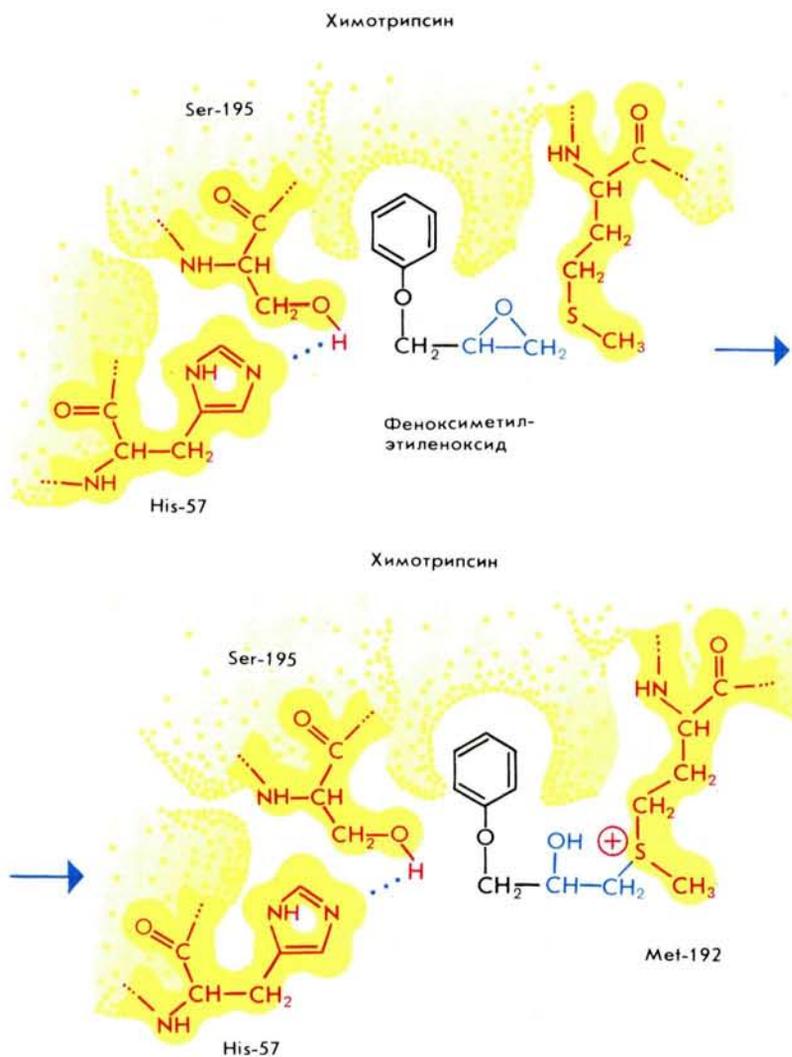


Д. Фарни и А. Толу (1963) использовали для исследования активного центра химотрипсина фенолметилсульфонилфторид, который избирательно реагирует с остатком серина (Ser-195).

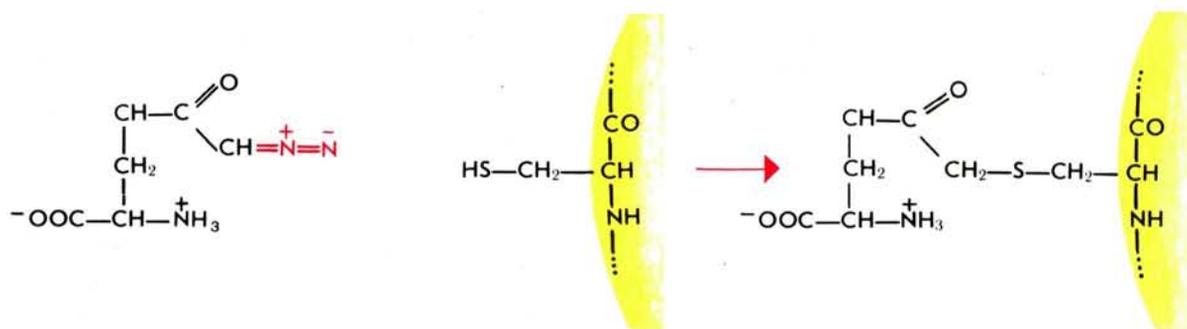
Реагенты для биоспецифической модификации белков часто содержат эпоксидную и диазогруппы. Так, Б. Хартли (1964) применил для модификации химотрипсина феноксиметилэтиленоксид, специфично взаимодействующий с остатком метионина (Met-192).



Скоффоне [Scoffone] Эрнесто (1923—1973), итальянский химик-органик. Окончил университет в Болонье (1946); с 1964 г.— директор Института органической химии в Падуе и профессор (1966) Падуанского университета. Ему принадлежат труды по синтезу природных полипептидов, методам избирательной модификации, выяснению их пространственного строения.



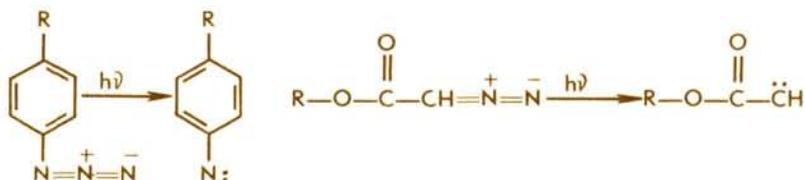
Т. К. Хартман (1963) показал, что структурный аналог глутамина — 6-диазо-5-оксо-L-норлейцин реагирует с сульфгидрильной группой цистеина в фосфорибозилпирофосфат-аминотрансферазе:



Аналогично метиловый эфир N-диазоацетилфенилаланина избирательно взаимодействует с остатком аспарагиновой кислоты (Asp-215) в активном центре пепсина, что приводит к полной инактивации фермента.

Частным случаем биоспецифической модификации является *фотоаффинная модификация*, основанная на использовании производного природного лиганда, содержащего фотореактивную группировку. При облучении УФ-светом происходит образование свободных радикалов, способных реагировать с самыми различными группировками белковой молекулы (в том числе и с СН-группой) в местах наиболее тесных контактов с лигандом.

В качестве предшественников активированных соединений обычно применяют разнообразные производные арилазидов и диазосоединений, генерирующие при фотолитическом разложении нитрены и карбены, соответственно:

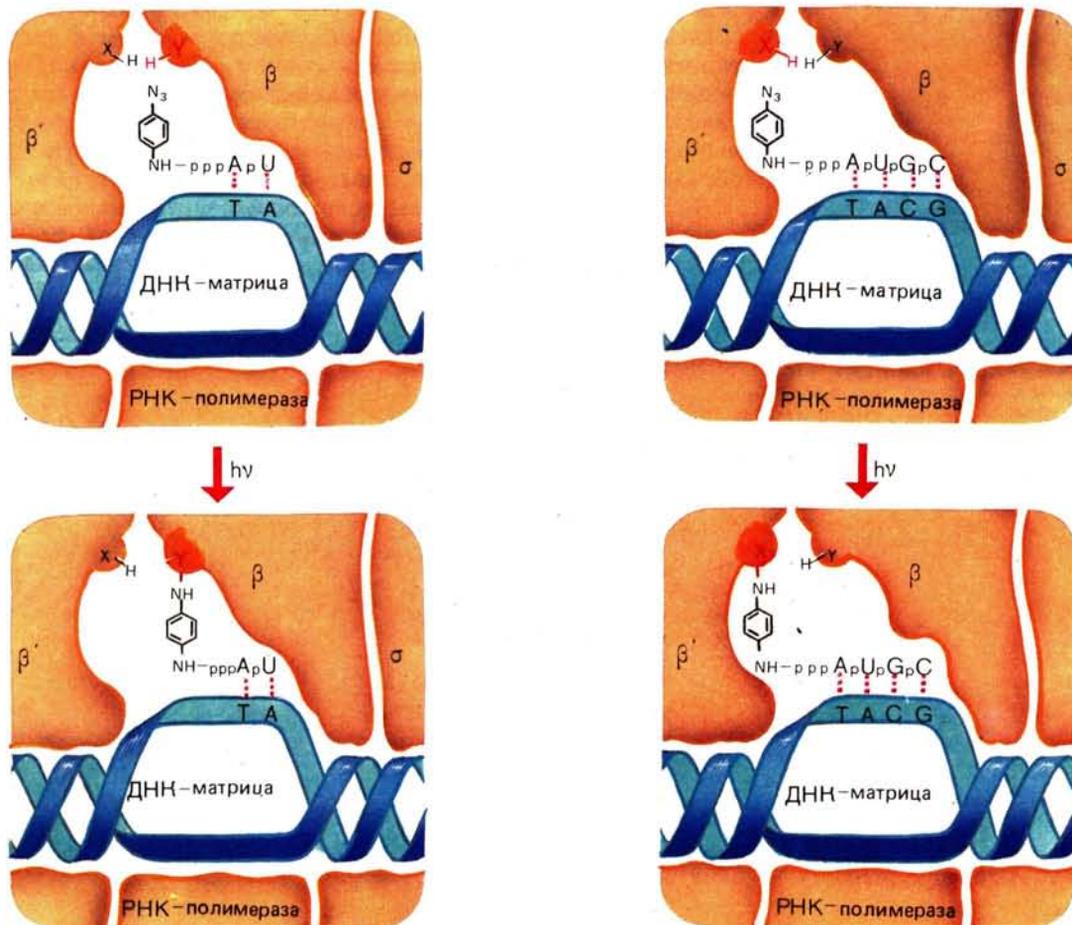


Преимущество метода заключается в возможности проводить модификацию на определенном этапе функционирования системы, однако выход «целевых» продуктов взаимодействия, как правило, низок из-за внутримолекулярных перегруппировок радикалов и других конкурирующих процессов. Поэтому при идентификации продуктов сшивок необходимо использовать радиоактивно меченные фотоаффинные реагенты.

В качестве примера фотоаффинной модификации рассмотрим локализацию в ДНК-зависимой РНК-полимеразе участков, контактирующих с 5'-концевой группой синтезируемой РНК. Были отработаны условия, в которых РНК-полимераза способна синтезиро-

вать олигонуклеотиды определенной длины, содержащие на 5'-конце фотореактивную (γ -азидоанилидную) группу. После облучения светом транскрипционного комплекса (РНК-полимераза — ДНК — РНК) в зависимости от длины синтезированного олигорибонуклеотида модифицировались различные субъединицы фермента. В частности, в случае динуклеотида главным образом модифицировалась β -субъединица, а в случае тетра-нуклеотида — β' -субъединица (рис. 83). Полученные результаты свидетельствовали о том, что центр связывания продукта изменяется в процессе синтеза РНК (Е. Д. Свердлов, 1980).

Рис. 83. Фотоаффинная модификация РНК-полимеразы аналогами РНК-продукта.



Топохимические трансформации пептидных систем

Общепринятый путь исследования зависимости между строением и биологическим действием природных пептидов заключается в получении их аналогов заменой одних аминокислотных остатков на другие и в сравнительном изучении биологических свойств синтезированных соединений.



Гудмэн [Goodman] Мюррей (р. 1928), американский биохимик. Окончил Калифорнийский университет в Беркли (1952); с 1964 г. — профессор Бруклинского политехнического института, а с 1970 г. — Калифорнийского университета в Сан Диего. Область научных интересов включает синтез и конформационный анализ пептидов и белковых систем. Получил ряд важных лекарственных препаратов.

Другой подход основан на модификации молекул с использованием особых приемов и приводит к аналогам нового типа, в которых при радикальном изменении молекулы как системы в целом сохраняются многие стереоэлектронные характеристики природного соединения. Такие аналоги, нередко успешно имитирующие исходный пептид и эффективно взаимодействующие с соответствующим рецептором или иным партнером в биохимическом процессе, называются топохимическими (М. М. Шемякин, Ю. А. Овчинников, В. Т. Иванов, 1967).

Примерами могут служить пептиды, полученные изменением направления ацилирования в пептидной цепи — так называемые ретро-изомеры (рис. 84, пара б — г), аналоги, образованные полным обращением конфигурации всех аминокислотных остатков (энантио-изомеры) (рис. 84, пара а — б), и особенно аналоги, сконструированные комбинацией этих двух приемов (ретро-энантио-изомеры) (рис. 84, пара а — г или а — в, рис. 85). Такого рода модификации касаются как циклических, так и линейных пептидов, однако в последнем случае для топохимического подобия аналогов необходимо, чтобы N- и C-концевые группы были соответствующим образом блокированы (рис. 86).

К числу топохимических операций следует отнести и циклизацию биологически активных линейных пептидов за счет амидных, дисульфидных или иных ковалентных связей. Такая модификация

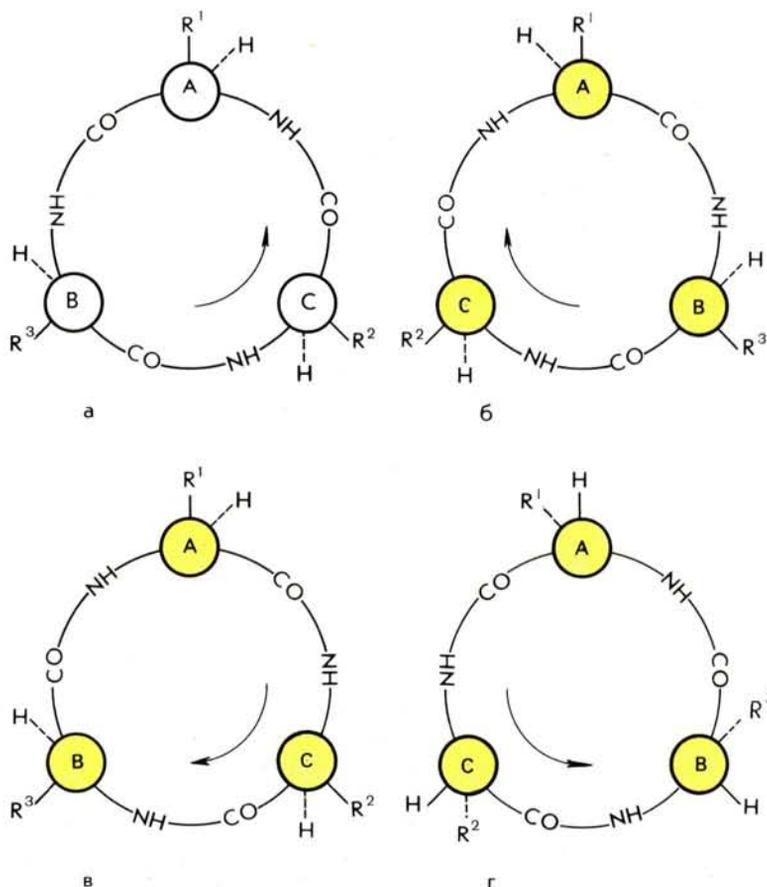


Рис. 84. Циклопептид А—В—С (а), его энантио-изомер (б) и ретро-энантио-изомер (в-г). Светлый кружок обозначает асимметрический атом C^{*}-L-аминокислотного остатка, затенённый — D-остатка.

оказывается особенно эффективной, если предварительно удастся доказать, что природный пептид взаимодействует с соответствующим рецептором в свернутой или квазициклической конформации. С другой стороны, если полученное циклическое производное обладает высокой биологической активностью, это служит веским аргументом в пользу того, что исходный линейный пептид имеет свернутую «биоспецифическую» конформацию. Особенностью такого рода трансформаций является возможность, при сравнительно небольшом изменении отдельных функциональных групп пептида, зафиксировать с разной степенью жесткости (в зависимости от величины образованного цикла) конформационные характеристики исследуемого соединения, т. е. получить в относительно «замороженном» состоянии одну из предпочтительных конформаций пептидной цепи.

Нельзя не отметить и такой прием, как замена в природном пептиде амидных связей на близкие им в стереоэлектронном отношении сложноэфирные; в случае биологически активных депептидов возможна и обратная замена — сложноэфирных связей на амидные, а также комбинация этих приемов.

Наконец, следует упомянуть и возможность модификации целых фрагментов пептида или белка без разрушения его общей биологически активной конформации: замену отдельных участков полипептидной цепи на углеводородные звенья ($-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2\dots$),

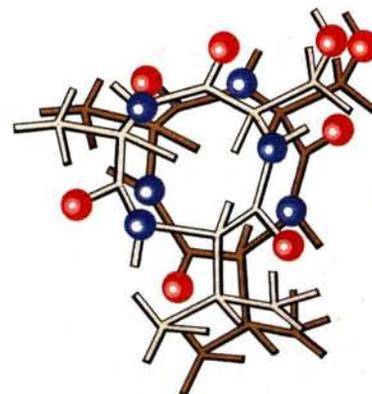
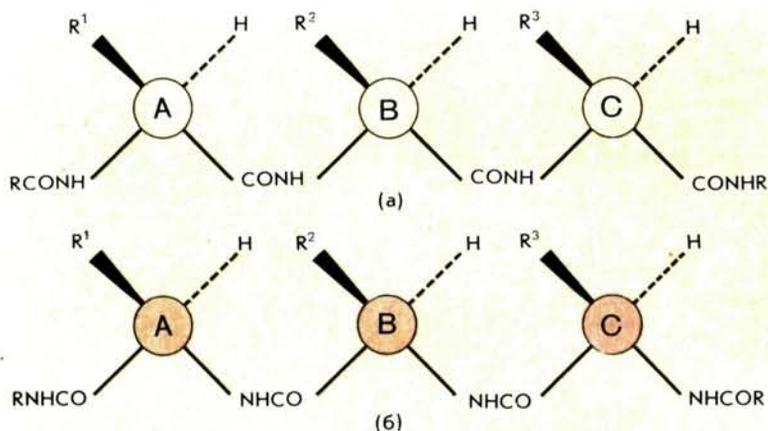


Рис. 85. Гипотетический циклотрипептид Ala—Val—Ser— (светлые линии) и его ретро-энантио-изомер D-Ala—D-Ser—D-Val— (тёмные линии), совмещенные в пространстве.



взаимную перестановку в молекуле пептида функционально важных фрагментов или получение биологически активных гибридных молекул, сочетающих в себе элементы структур близких по функции природных пептидов. Термин «топохимические аналоги» в этом случае сохраняет свое значение.

Топохимический принцип трансформации природных пептидов оказался весьма плодотворным при получении интересных в биологическом отношении аналогов пептидных антибиотиков (М. М. Шемякин, Ю. А. Овчинников), пептидных гормонов (Г. И. Чипенс, Р. Хиршман), нейропептидов (М. Гудмэн) и т. п.

Рис. 86. Трипептид RCO—A—B—C—NHR (a) и его ретро-энантио-изомер (b). Обозначения кружков те же, что и на рис. 84.

Биологическая роль белков

Ферменты



Берцелиус [Berzelius] Йенс Якоб (1779—1848), шведский химик, иностранный почетный член Петербургской АН (1820). Окончил Упсальский университет (1801), в 1807—1832 гг. — профессор Медико-хирургического института в Стокгольме. Один из основателей современной химии. Ввел в химию атомистику, составил таблицу атомных масс большинства элементов. Развил основы электрохимической теории. Впервые распространил основные законы химии на органическую химию.

Ферменты — наиболее важный класс белковых веществ, универсальный по своей биологической функции. Ферменты представляют собой специфические и высокоэффективные катализаторы химических реакций, протекающих в живой клетке. Изучение ферментов, их строения, свойств и механизма биологического действия составляет один из главных разделов биохимии и биоорганической химии. К настоящему времени охарактеризовано несколько тысяч ферментов, свыше тысячи из них получены в индивидуальном состоянии. Для многих сотен белков-ферментов выяснена аминокислотная последовательность, а самые известные из них расшифрованы с помощью рентгеноструктурного анализа до уровня полной пространственной структуры. Изучение любой проблемы в области познания механизмов жизнедеятельности обязательно связано с исследованием соответствующих ферментных систем. Кроме того, ферменты широко используются как мощные инструменты при выяснении строения биополимеров и при генно-инженерных разработках. Они находят широкое практическое применение в медицине и пищевой промышленности.

Исторический очерк. Ферментативные процессы известны человеку с глубокой древности. В частности, брожение широко использовалось греками для получения вина (открытие этого способа приписывалось богу Бахусу). Народы многих стран издавна владели искусством приготовления хлеба, сыра, уксуса на основе переработки растительного и животного сырья. Однако современный этап в развитии энзимологии относится к началу прошлого века. В 1814 г. член Петербургской Академии наук К. Кирхгоф установил, что крахмал превращается в сахар под действием некоторых веществ, находящихся в прорастающих зернах ячменя. Дальнейший шаг вперед в этом направлении был сделан французскими химиками А. Пайеном и Ж. Пирсо, которые в 1833 г. показали, что термолабильный фактор, получаемый из солодового экстракта путем осаждения спиртом, обладает способностью гидролизовать крахмал; они назвали его диастазой. Вскоре разгорелся спор о природе брожения, в котором участвовали крупнейшие представители естествознания того времени. В частности, Л. Пастер придерживался мнения, что брожение вызывается живыми микроорганизмами и, следовательно, связано исключительно с их жизнедеятельностью. С другой стороны, Ю. Либих и К. Бернар отстаивали химическую природу брожения, считая, что оно связано с особыми веществами, подобными диастазе (амилазе). Й. Берцелиус в 1837 г. показал, что ферменты — это катализаторы, поставляемые живыми клетками. Именно тогда появились термины «фермент» (от лат. *fermentatio* — брожение) и «энзим» (от греч. *εν ζυμη* — в дрожжах). Спор был окончательно разрешен лишь в 1897 г., когда немецкие ученые братья Ганс и Эдвард Бухнеры показали, что дрожжевой бесклеточный сок (полученный при растирании дрожжей с инфузورной землей) способен сбраживать сахар с образованием спирта и CO_2 . Стало ясным, что дрожжевой сок содержит сложную смесь ферментов (названную зимазой) и эти ферменты способны функционировать как внутри, так и вне клеток. По словам одного из историков,

появление пузырьков углекислого газа в опыте Бухнеров означало рождение современной биохимии и энзимологии.

Попытки выделить ферменты в индивидуальном состоянии предпринимали многие исследователи, среди которых следует упомянуть А. Я. Данилевского, Р. Вильштеттера и др. Белковая природа ферментов была однозначно доказана в 1926 г. американским биохимиком Дж. Самнером, выделившим в кристаллическом виде фермент уреазу из семян канавалии. В 1930 г. Дж. Норттроп получил кристаллический пепсин, а затем трипсин и химотрипсин. С этого периода стало общепринятым утверждение, что все ферменты являются белками.

В конце XIX в. на базе достижений в области исследования структуры органических соединений биологического происхождения появилась возможность изучения специфичности ферментов. В это время Э. Фишером было выдвинуто знаменитое положение о необходимости стерического соответствия между ферментом и субстратом; по его образному выражению, «субстрат подходит к ферменту, как ключ к замку». В начале нашего века были заложены основы исследования кинетики действия ферментов.



Самнер [Sumner] Джеймс Бетчеллер (1887—1955), американский биохимик. Окончил Гарвардский университет (1910), с 1929 г. — профессор Корнеллского университета. Основные работы — в области химии ферментов. Получил первые кристаллические препараты ферментов с высокой биологической активностью, в том числе уреазу, и доказал, что они являются белками. Лауреат Нобелевской премии по химии (1946, совместно с У. Стэнли и Дж. Норттропом).

Общая характеристика ферментов

Ферменты имеют различные молекулярные массы — от 10 000 до 1 000 000 и выше. Они могут быть построены из одной полипептидной цепи, нескольких полипептидных цепей или представлять собой сложные (иногда полиферментные) комплексы. В состав фермента входят и небелковые компоненты, получившие название коферментов (кофакторов), — ионы металлов, небольшие органические молекулы типа витаминов и т. п.

Ферменты являются высокоэффективными катализаторами: они способны увеличивать скорости реакций в миллионы и миллиарды раз. Так, например, уреазы (при pH 8,0, 20 °C) ускоряет гидролиз мочевины примерно в 10^{14} раз.

Ферменты являются высокоспецифичными катализаторами. Они проявляют специфичность в отношении типа катализируемой химической реакции, причем образования побочных продуктов не происходит. Кроме того, они обладают выраженной субстратной специфичностью и, как правило, высокой стереоспецифичностью.

Классификация ферментов. Ранее при наименовании ферментов за основу брали название субстрата с добавлением суффикса «аза»; так появились, в частности, протеиназы, липазы, карбогидразы. По сходному принципу обозначали ферменты, катализирующие окислительные реакции (дегидрогеназы). Некоторые ферменты получили специальные названия — трипсин, пепсин и др. В настоящее время принята классификация, в которой ферменты сгруппированы в 6 классов в соответствии с типом катализируемых реакций:

1. Оксидоредуктазы (окислительно-восстановительные реакции).
2. Трансферазы (реакции переноса функциональных групп).
3. Гидролазы (реакции гидролиза).
4. Лиазы (реакции отщепления групп негидролитическим путем).
5. Изомеразы (реакции изомеризации).
6. Лигазы (реакции синтеза за счет энергии АТФ).



Бухнер (Buchner) Эдуард (1860—1917), немецкий химик. Окончил Мюнхенский университет (1888), с 1893 г.— профессор Кильского, Тюбингенского университетов, затем университетов в Бреслау и Вюрцбурге. Основные работы — в области органической химии и энзимологии. Установил (1897), что процесс брожения может протекать без участия низших организмов (в присутствии дрожжевого сока, содержащего энзим, названный им зимазой). Лауреат Нобелевской премии по химии (1907).

В пределах классов ферменты группируются в подклассы и подподклассы в соответствии с особенностями катализируемых реакций; на этой основе составлена кодовая нумерация (шифры) ферментов и их систематические названия. Шифр фермента состоит из четырех разделенных точками чисел: первое число означает класс фермента, второе и третье числа — подкласс и подподкласс соответственно, а четвертое число — порядковый номер фермента в его подподклассе. Например, кислая фосфатаза имеет шифр 3.1.3.2; это означает, что она относится к классу гидролаз (3.1.3.2), подклассу этих ферментов, действующих на сложноэфирные связи (3.1.3.2), к подподклассу ферментов, гидролизующих моноэфиры фосфорной кислоты (3.1.3.2), а порядковый номер фермента в данном подподклассе — 2 (3.1.3.2).

Ферменты, катализирующие одну и ту же реакцию, но выделенные из разных видов живых организмов, различаются между собой. В номенклатуре же они имеют общее название и один кодовый номер. Различные формы того или иного фермента нередко встречаются и у одного биологического вида. Для наименования группы ферментов, катализирующих одну и ту же реакцию и находящихся в организмах одного вида, рекомендуется термин *множественные формы фермента*. Для тех ферментов одной группы, которые имеют генетически обусловленные различия в первичной структуре, используют термин «изоферменты».

Принципы ферментативной кинетики

Определение скоростей ферментативных реакций и исследование влияния на них различных факторов составляют содержание ферментативной кинетики. Кинетические исследования широко используются для определения сродства субстратов и ингибиторов к ферментам, для установления механизма их действия.

К числу главных факторов, влияющих на скорости ферментативных реакций, относятся: концентрация фермента, концентрация

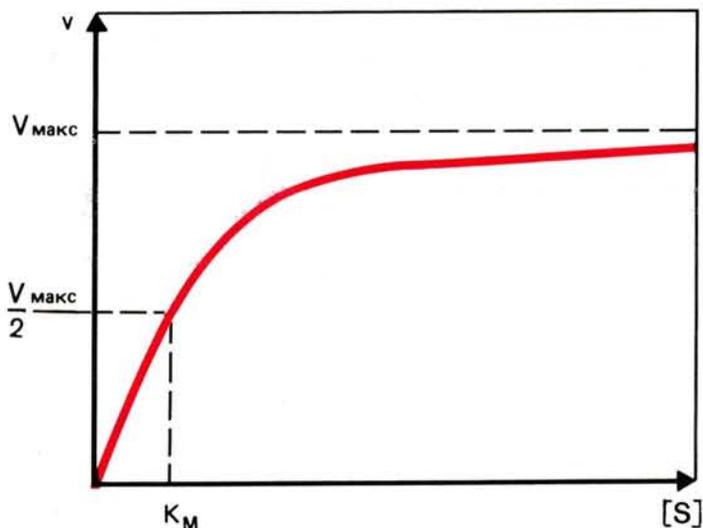


Рис. 87. График зависимости скорости реакции v от концентрации субстрата $[S]$.

субстрата, присутствие ингибиторов или активаторов, pH и температура среды.

В подавляющем большинстве случаев скорость ферментативной реакции v прямо пропорциональна концентрации фермента $[E]$:

$$v = k[E].$$

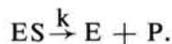
Один из наиболее важных факторов, определяющих скорость ферментативной реакции, — концентрация субстрата. При исследовании зависимости скорости реакции от концентрации субстрата $[S]$ во многих случаях наблюдается следующая характерная картина (рис. 87): при относительно небольших значениях $[S]$ величина v пропорциональна $[S]$, а при достаточно больших $[S]$ величина v приближается к предельному постоянному значению, называемому *максимальной скоростью* ($V_{\text{макс.}}$).

На основании анализа зависимости v от $[S]$ Л. Михаэлис и М. Ментен сформулировали в 1913 г. общую теорию кинетики действия ферментов.

Они постулировали, в частности, что ферментативная реакция является двухстадийной. На первой стадии фермент вступает в быстрое обратимое взаимодействие с субстратом; в результате образуется фермент-субстратный комплекс ES:



На второй стадии ES распадается с образованием продукта реакции P:



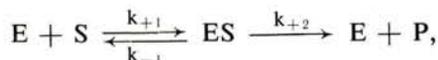
Вторая стадия лимитирует скорость процесса; последняя определяется концентрацией комплекса ES и константой скорости его распада k . На основании этих предпосылок было выведено уравнение, связывающее v и $[S]$, известное под названием уравнения Михаэлиса:

$$v = \frac{V_{\text{макс.}} \cdot [S]}{K_M + [S]},$$

где v — начальная скорость реакции, т. е. скорость, регистрируемая в течение периода времени, за который убыль субстрата не превышает $\sim 10\%$. В этот период времени скорость реакции можно считать приблизительно постоянной, поскольку, во-первых, убыль субстрата невелика, а, во-вторых, концентрация продукта, который в ряде случаев может оказывать ингибирующее действие, незначительна.

В уравнение входят две постоянные величины: $V_{\text{макс.}}$ — максимальная скорость, т. е. скорость реакций в условиях насыщения фермента субстратом, и K_M — константа Михаэлиса для исследуемой пары фермент — субстрат.

Легко показать, что для одностадийной реакции, протекающей по схеме:



где k_{+1} — константа скорости образования ES, k_{-1} — константа скорости обратного распада ES на E и S, k_{+2} — константа скорости распада ES с образованием продукта P, уравнение Михаэлиса справедливо и без допущения о том, что на стадии образования ES устанавливается равновесие и что стадия распада ES с образованием



Нортроп [Northrop] Джон Хоуард (р. 1891), американский биохимик. Окончил Колумбийский университет (1912), с 1915 г. — в Рокфеллеровском институте медицинских исследований. Основные работы — по изучению механизма и кинетики ферментативных реакций, свойств ферментов. Доказал белковую природу ферментов (1937, наряду с Дж. Самнером). Впервые выделил в кристаллическом виде химотрипсин, пепсин, трипсин. Лауреат Нобелевской премии по химии (1946, совместно с У. Стэнли и Дж. Самнером).



Михаэлис (Michaelis) Леонор (1875—1949), немецкий химик и биохимик. Окончил Берлинский университет (1896), с 1929 г. работал в Рокфеллеровском институте медицинских исследований в Нью-Йорке. Основные работы посвящены изучению ферментативных реакций. Ввел (1913) константу в уравнение зависимости скорости ферментативного процесса от концентрации субстрата (константа Михаэлиса). Разработал теорию образования фермент-субстратных комплексов (теория Михаэлиса — Ментена, совместно с М. Ментеном).

продукта является лимитирующей. При этом K_M может быть выражена через константы скоростей отдельных стадий:

$$K_M = \frac{k_{-1} + k_{+2}}{k_{+1}}$$

Величины $V_{\text{макс.}}$ и K_M можно определить по графику зависимости v от $[S]$ (рис. 87); $V_{\text{макс.}}$ находим на графике как предел, к которому стремится v при увеличении $[S]$. Из уравнения Михаэлиса следует, что при достаточно высокой концентрации субстрата (когда $[S] \gg K_M$)

$$v = V_{\text{макс.}}$$

т. е. скорость постоянна и максимальна; реакция протекает по кинетическому закону нулевого порядка.

При низких концентрациях субстрата v прямо пропорциональна $[S]$; действительно, при $[S] \ll K_M$ по уравнению Михаэлиса оказывается, что

$$v = \frac{V_{\text{макс.}} \cdot [S]}{K_M};$$

в таких условиях реакция протекает по кинетическому закону первого порядка. На графике (рис. 87) это соответствует начальному линейному участку.

Для определения величины K_M снова обратимся к уравнению Михаэлиса; из него следует, что K_M численно равна концентрации субстрата, при которой скорость реакции равна половине максимальной; действительно, при условии, что $v = \frac{V_{\text{макс.}}}{2}$, имеем:

$$\frac{V_{\text{макс.}}}{2} = \frac{V_{\text{макс.}} \cdot [S]}{K_M + [S]} \text{ и } K_M = [S].$$

Для графического определения K_M сначала требуется найти величину $v = \frac{V_{\text{макс.}}}{2}$, а затем через соответствующую точку на ординате провести прямую, параллельную оси абсцисс до пересечения с гра-

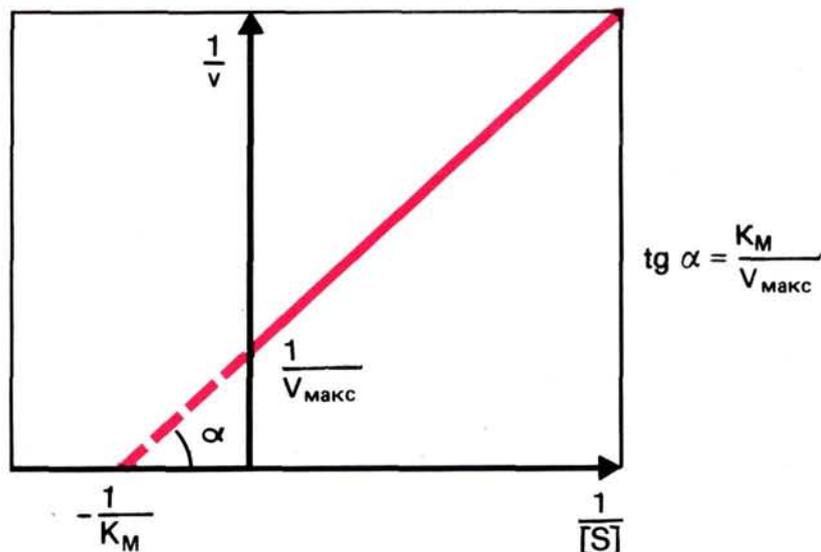


Рис. 88. График зависимости обратной скорости $\frac{1}{v}$ от обратной концентрации субстрата $\frac{1}{[S]}$.

фигом; перпендикуляр, опущенный из точки пересечения на ось абсцисс, покажет величину $[S]$, численно равную K_M (рис. 87).

Более удобно для определения величин $V_{\text{макс.}}$ и K_M использовать графики линеаризованных форм уравнения Михаэлиса. Одной из таких форм является уравнение, обратное уравнению Михаэлиса:

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{\text{макс.}}} + \frac{K_M}{V_{\text{макс.}}} \cdot \frac{1}{[S]}$$

его называют уравнением Лайнуивера — Берка. График зависимости $\frac{1}{v}$ от $\frac{1}{[S]}$ (рис. 88) представляет собой прямую, имеющую наклон $K_M/V_{\text{макс.}}$ и отсекающую на оси ординат отрезок, равный $\frac{1}{V_{\text{макс.}}}$, а на оси абсцисс отрезок, равный $\frac{1}{K_M}$.

Большинство ферментов катализируют реакции с участием двух (или более) субстратов:



Исследование кинетики таких реакций позволяет определить величины K_M и $V_{\text{макс.}}$ для каждого из субстратов; для этого строят графики зависимости скорости реакции от концентрации одного из субстратов при фиксированной (обычно насыщающей) концентрации другого.

Единицы активности ферментов. Активность препаратов ферментов обычно выражают в международных единицах активности. Активностью, равной одной международной единице, обладает такое количество фермента, которое катализирует превращение 1 мкмоль субстрата в продукт за 1 мин в стандартных (обычно оптимальных) условиях. Удельная активность — это число единиц активности на 1 мг белка препарата фермента. Удельная активность отражает степень очистки фермента; она максимальна у чистого фермента.

Международный биохимический союз предложил использовать в качестве единицы активности «катал» (кат); активностью 1 кат обладает такое количество фермента, которое катализирует превращение 1 моль субстрата в продукт за 1 с. Следовательно, 1 кат = $60 \cdot 10^6 = 6 \cdot 10^7$ международных единиц. Рекомендовано использовать также единицу значительно меньшего масштаба — нанокатал (нкат), равную 10^{-9} кат.

Ингибиторы ферментов. Действие многих ферментов может быть заторможено определенными химическими соединениями — ингибиторами. С помощью ингибиторов получают ценную информацию о специфичности ферментов, природе функциональных групп их активных центров и о механизме действия.

По характеру действия ингибиторы разделяют на *необратимые* и *обратимые*.

Необратимые ингибиторы химически модифицируют важные для активности функциональные группы фермента. Естественно, что после удаления свободного ингибитора путем диализа активность модифицированного фермента не восстанавливается. Эффективность действия необратимого ингибитора характеризуется константой скорости процесса ингибирования. В ряде случаев активность модифицированного фермента можно восстановить, удалив присоединившийся необратимый ингибитор путем соответствующей химической реакции; этот процесс принято называть реактивацией.

Примерами необратимых ингибиторов являются диизопропилфторфосфат (ДФФ) и иодацетамид. ДФФ инактивирует ряд гидролаз (химотрипсин, трипсин, ацетилхолинэстеразу), модифицируя важный для активности этих ферментов остаток серина (рис. 89). Иодацетамид инактивирует ферменты, функционально значимой группой которых является остаток цистеина (глицеральдегидфосфатдегидрогеназа, папаин).

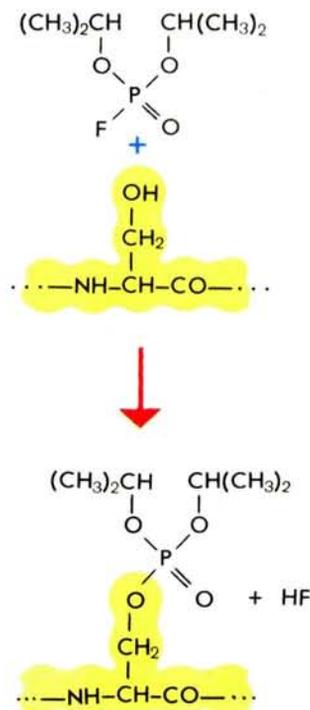


Рис. 89. Инактивация диизопропилфторфосфатом сериновой протеиназы.

Обратимые ингибиторы взаимодействуют с ферментом без образования ковалентной связи. После инкубации с обратимым ингибитором активность фермента восстанавливается при удалении свободного ингибитора путем диализа. Характерная для соответствующей системы степень ингибирования достигается в общем случае относительно быстро и далее не зависит от времени, что указывает на наличие равновесия при образовании комплекса ингибитора I с ферментом $E + I \rightleftharpoons EI$.

Константа ингибирования K_i при обратимом ингибировании — это константа диссоциации комплекса фермент-ингибитор

$$K_i = \frac{[E] \cdot [I]}{[EI]}$$

Она является величиной, обратной величине сродства ингибитора к ферменту.

Различаются два вида обратимых ингибиторов — конкурентные и неконкурентные. Конкурентные ингибиторы по строению обычно сходны с субстратом; они конкурируют с ним за связывание с ферментом. Скорость реакции в присутствии конкурентного ингибитора определяется выражением

$$v = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{K_M (1 + [I]/K_i) + [S]}$$

Характерная черта конкурентного ингибирования состоит в том, что эффективность ингибирования зависит от соотношения концентраций субстрата и ингибитора (а не от абсолютной концентрации ингибитора).

Неконкурентные (обратимые) ингибиторы, как правило, не имеют сходства с субстратом. Они могут обратимо связываться как со свободным ферментом, так и с ES-комплексом и не конкурируют с субстратом, т. е. не вытесняют его из комплекса с ферментом. Скорость реакции в присутствии неконкурентного ингибитора может быть выражена уравнением

$$v = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{(K_M + [S]) (1 + [I]/K_i)}$$

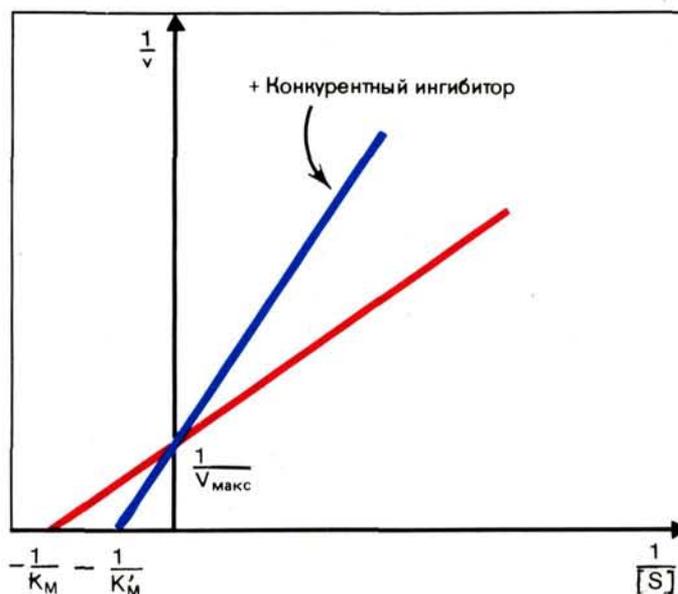


Рис. 90. График зависимости обратной скорости $\frac{1}{v}$ от обратной концентрации $\frac{1}{[S]}$ в присутствии конкурентного ингибитора.

Эффективность неконкурентного ингибирования определяется концентрацией ингибитора и не зависит от соотношения концентраций ингибитора и субстрата.

Тип обратимого ингибирования (конкурентное или неконкурентное) устанавливается определением зависимости скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата в присутствии ингибитора. Для выяснения типа ингибирования и величины K_i пользуются графиками зависимости обратной скорости реакции от обратной концентрации субстрата; в случае систем с обратимыми ингибиторами они являются линейными.

При конкурентном ингибировании выражение для величины обратной скорости реакции следующее:

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{\max}} + \frac{K_M}{V_{\max}} (1 + [I]/K_i) \frac{1}{[S]}.$$

Графики зависимости $\frac{1}{v}$ от $\frac{1}{[S]}$ в отсутствие и в присутствии конкурентного ингибитора приведены на рисунке 90. Об эффективности связывания конкурентного ингибитора можно судить по величине наклона графика.

При наличии в системе конкурентного ингибитора величина отрезка, отсекаемого на оси ординат ($\frac{1}{V_{\max}}$), не изменяется; в то же время изменяется величина отрезка, отсекаемого на оси абсцисс. Ее значение равно $\frac{1}{K'_M}$, где K'_M — кажущаяся величина K_M в присутствии ингибитора

$$K'_M = \frac{K_M}{1 + [I]/K_i},$$

откуда следует, что

$$K_i = \frac{1}{K'_M/K_M - 1}.$$

При неконкурентном ингибировании величина обратной скорости реакции выражается уравнением

$$\frac{1}{v} = \left(\frac{1}{V_{\max}} + \frac{K_M}{V_{\max}} \cdot \frac{1}{[S]} \right) \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right).$$

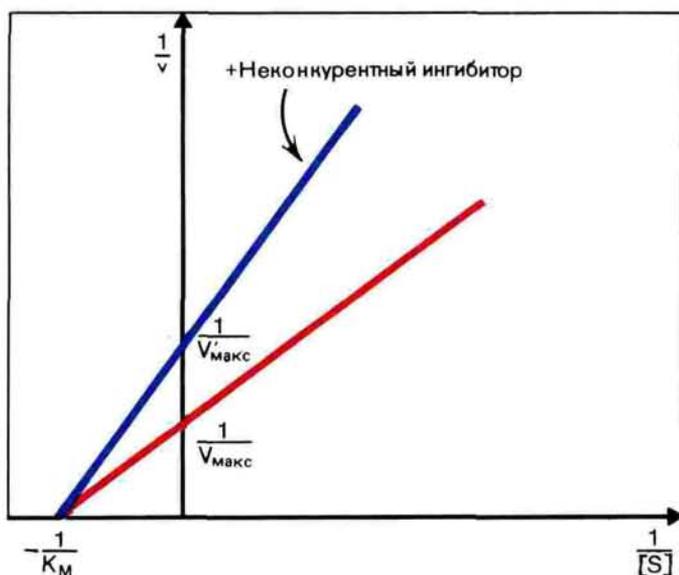


Рис. 91. График зависимости обратной скорости $\frac{1}{v}$ от обратной концентрации $\frac{1}{[S]}$ в присутствии неконкурентного ингибитора.

Графики зависимости $\frac{1}{v}$ от $\frac{1}{[S]}$ в отсутствие и в присутствии неконкурентного ингибитора приведены на рисунке 91. В присутствии ингибитора величина отрезка, отсекаемого на оси абсцисс, остается постоянной, т. е. величина K_M не меняется. Величина отрезка, отсекаемого на оси ординат, изменяется, она становится равной $\frac{1}{V'_{\max}}$, где V'_{\max} — кажущаяся величина V_{\max} в присутствии ингибитора

$$\frac{1}{V'_{\max}} = \frac{1 + [I]/K_i}{V_{\max}}$$

из чего следует, что

$$K_i = \frac{[I]}{V_{\max}/V'_{\max} - 1}$$

Активаторы ферментов. Активность некоторых ферментов может увеличиваться в результате их взаимодействия с определенными соединениями — активаторами. В том случае, когда активатор А, связываясь с ферментом, влияет на связывание субстрата, выражение для обратной скорости реакции имеет вид, формально сходный с соответствующим выражением для конкурентного ингибирования:

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{\max}} + \frac{K_M}{V_{\max}} \left(1 + \frac{K_a}{[A]} \right) \frac{1}{[S]}$$

где K_a — константа диссоциации комплекса фермент — активатор.

Если связывание активатора не влияет на связывание субстрата (и наоборот), зависимость $\frac{1}{v}$ от $\frac{1}{[S]}$ имеет вид, сходный с соответствующим выражением для неконкурентного ингибирования:

$$\frac{1}{v} = \left(\frac{1}{V_{\max}} + \frac{K_M}{V_{\max}} \cdot \frac{1}{[S]} \right) \left(1 + \frac{K_a}{[A]} \right)$$

Такой вид активации называют неконкурентным, поскольку при повышении концентрации активатора v увеличивается, а K_M не изменяется.

Кооперативные эффекты и регуляторные ферменты. Ферменты, имеющие один активный центр, обычно функционируют в соответствии с кинетикой Михаэлиса; при этом график зависимости v от $[S]$ имеет вид гиперболы (рис. 87). Для ферментов с олигомерной структурой, т. е. с несколькими активными центрами, кинетика функционирования не является однозначной.

В том случае, когда находящиеся в различных субъединицах активные центры кинетически независимы, график зависимости v от $[S]$ представляет собой гиперболу: если же между активными центрами имеется взаимодействие (они функционируют кооперативно), график будет иметь сигмоидальную форму. Такой тип функционирования наблюдается у ряда олигомерных внутриклеточных ферментов, выполняющих важные регуляторные функции. В качестве примера на рисунке 92 приведен график зависимости v от $[S]$ для аспартат-транскарбамоилазы. При повышении концентрации субстрата скорость реакции возрастает вначале относительно медленно, а затем значительно быстрее; прирост скорости резко уменьшается только перед достижением максимального значения. Благодаря сигмоидальному характеру зависимости v от $[S]$ оказывается возможным более эффективное регулирование скорости, чем в случае ферментов с «михаэлисовой» кинетикой.

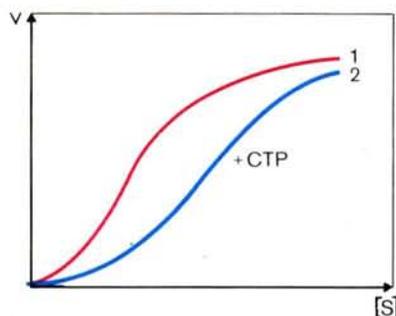


Рис. 92. Зависимость скорости реакции, катализируемой аспартат-транскарбамоилазой, от концентрации аспартата; влияние ингибирующего эффектора (СТР — цитидинтрифосфат): 1 — в отсутствие эффектора; 2 — в присутствии эффектора.

Активность регуляторных ферментов обратимо модулируется (ингибируется или стимулируется) определенными метаболитами, которые называют *аллостерическими* эффекторами. Название «аллостерические» (от греч. *αλλοζ* — другой, *ετεροζ* — пространство) эти эффекторы получили потому, что, как правило, они не имеют структурного сходства с субстратом (или продуктом) реакции, катализируемой соответствующим ферментом. Они связываются не с активным центром фермента, а со специальными участками, которые называют регуляторными центрами. По предложению Ж. Моно, ферменты, активность которых модулируется аллостерическими эффекторами, были названы аллостерическими.

Эффекторы аллостерических ферментов изменяют степень сигмоидальности графика зависимости v от $[S]$. Ингибирующий (отрицательный) эффектор смещает этот график вправо, и он становится более сигмоидальным; активирующий (положительный) эффектор смещает график в противоположную сторону, приближая его по форме к гиперболе. Влияние ингибирующего эффектора на активность аспартат-транскарбамоилазы показано на рисунке 92.

Влияние pH на активность ферментов. Ферменты, как и другие белки, имеют большое число ионных групп. Изменение состояния ионизации таких групп при сдвиге pH может оказывать сильное влияние на активность фермента. В первую очередь это касается групп, участвующих в катализе или в связывании субстрата.

Для каждого фермента имеется определенное значение pH, при котором скорость катализируемой реакции максимальна (оптимум pH). В таблице 8 приведены значения оптимумов pH для некоторых гидролитических ферментов. Видно, что эти значения сильно различаются; так, например, для пепсина оптимум находится при pH 1,5, а для щелочной фосфатазы — 9,0 — 10,0. Большинство ферментов имеют оптимум pH в нейтральной области (7,0 — 8,0).

Влияние температуры на активность ферментов. Согласно закону Вант-Гоффа скорость химических реакций увеличивается примерно в два раза при повышении температуры на 10 °C (коэффициент Q_{10}). Это правило справедливо также и для ферментативных реакций, однако только в ограниченной области значений температуры. При повышении температуры свыше 40 — 50 °C происходит инактивация белкового катализатора из-за тепловой денатурации. Следовательно, ферментативные реакции отличаются от реакций, катализируемых соединениями небелковой природы, наличием температурного оптимума. Причиной быстрого падения активности является высокая величина коэффициента Q_{10} для процесса тепловой денатурации белка. Следует отметить, что ферменты термофильных бактерий имеют весьма высокий температурный оптимум.

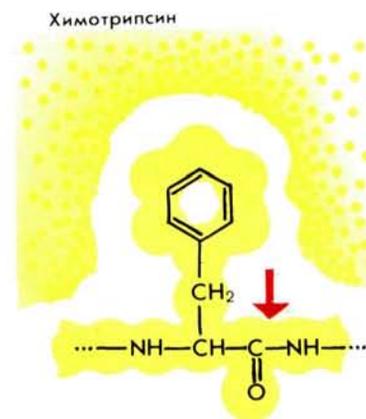
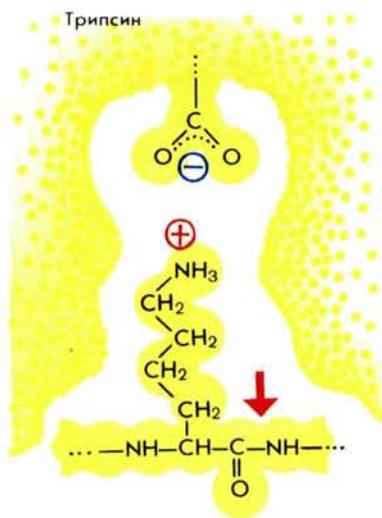


Моно [Monod] Жак Люсьен (1910—1976), французский биохимик и микробиолог. Окончил Парижский университет (1934), работал там же (с 1959 г. — профессор). Совместно с Ф. Жакобом высказал гипотезы о переносе генетической информации и механизме генетической регуляции синтеза белка в бактериальных клетках. Разработал теорию роста и развития бактерий, доказал возможность управления этим ростом. Лауреат Нобелевской премии по физиологии и медицине (1965, совместно с Ф. Жакобом и А. М. Львовым).

Таблица 8

Оптимум pH действия некоторых гидролитических ферментов

Фермент	Субстрат	Оптимум pH
Пепсин	Яичный альбумин	1,5
α-Амилаза солода	Крахмал	4,5
Кислая фосфатаза плазмы	2-Глицерофосфат	4,5 — 5,0
α-Глюкозидаза	α-Метилглюкозид	5,4
Уреаза	Мочевина	6,4 — 6,9
Трипсин	Белки	7,8
Панкреатическая α-амилаза	Крахмал	6,7 — 7,2
Карбоксипептидаза А	Различные субстраты	7,5
Щелочная фосфатаза плазмы	2-Глицерофосфат	9 — 10
Аргиназа	Аргинин	9,5 — 9,9



Активный центр. Важная особенность ферментативного катализа состоит в том, что фермент образует с субстратом фермент-субстратный комплекс, и химическое превращение субстрата происходит в составе комплекса. В этом комплексе субстрат связывается с определенной зоной фермента, называемой *активным центром*; именно в активном центре происходит превращение субстрата в продукт.

Активные центры ферментов имеют ряд общих черт. Так, обычно активный центр занимает относительно небольшую часть молекулы фермента. Кроме того, активный центр — это трехмерная структура, часто имеющая, как показывают рентгеноструктурные данные, форму щели или впадины в глобуле фермента. Активный центр формируется аминокислотными остатками, находящимися в различных, обычно значительно удаленных друг от друга участках полипептидной цепи. Условно в активном центре можно выделить два участка — связывающий и каталитический. Остатки аминокислот, образующие связывающий участок, обеспечивают удержание субстрата в активном центре. Именно «архитектура» связывающего участка активного центра фермента определяет его комплементарность структуре субстрата, т. е. специфичность фермента. Взаимодействие между субстратом и связывающим участком активного центра осуществляется за счет кооперативного действия сил различной природы. Оно обеспечивается электростатическими и водородными связями, гидрофобными и ван-дер-ваальсовыми взаимодействиями. Вклады этих сил могут быть весьма различными у разных ферментов. Примером, показывающим участие электростатических сил в связывании субстрата, может служить взаимодействие субстрата с активным центром трипсина. В то же время гидрофобные взаимодействия играют доминирующую роль при связывании субстрата в случае химотрипсина. Наконец, примером,

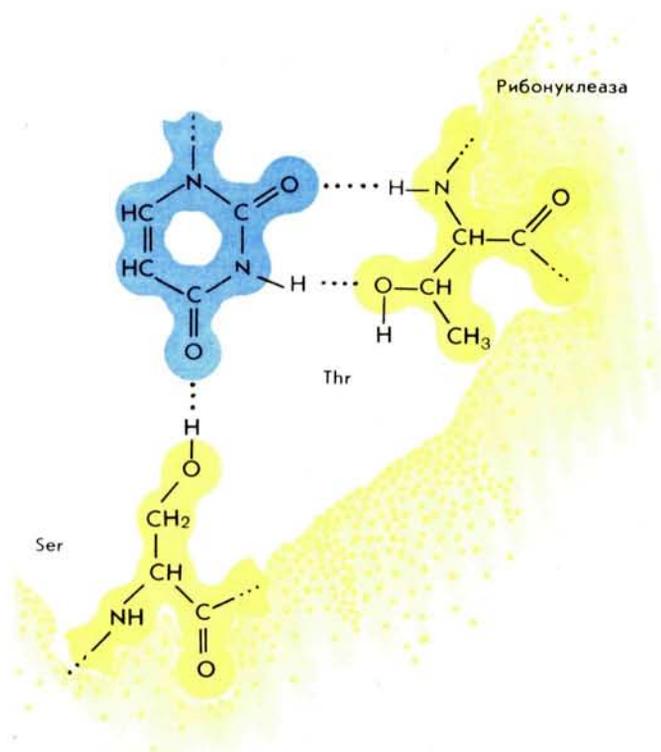


Рис. 93. Образование водородных связей при связывании субстрата с рибонуклеазой.

иллюстрирующим роль водородных связей, является связывание субстрата с панкреатической РНКазой. На рисунке 93 показаны водородные связи, образуемые уридиновым фрагментом РНК с группами связывающего участка фермента.

В каталитический участок фермента входят остатки аминокислот, непосредственно участвующие в катализе. Их называют каталитическими группами. В качестве каталитических обычно выступают ионогенные группы.

Одна из главных задач при установлении механизма действия фермента — идентификация функциональных групп его активного центра, в первую очередь каталитических. Наиболее прямой путь — это использование необратимых ингибиторов, селективно модифицирующих определенные аминокислотные остатки. В одних случаях модификация каталитических групп оказывается возможной вследствие их высокой реакционной способности, в других она достигается в результате использования ингибиторов, связывающихся в активном центре. В соответствии с этим различают две группы необратимых ингибиторов. Представители первой группы не имеют структурного сходства с субстратом, но избирательно модифицируют каталитические группы благодаря высокой реакционной способности последних. В качестве примера можно привести модификацию диизопропилфторфосфатом уникально реакционноспособного остатка серина в каталитическом центре химотрипсина (рис. 89). Ингибиторы другой группы являются структурными аналогами субстратов, содержащими реакционноспособные группировки. Эти ингибиторы сначала нековалентно связываются в зоне активного центра, а затем благодаря наличию реакционноспособной группировки модифицируют локализованные и находящиеся вблизи функциональные группы, образуя с ними ковалентные связи. Рассматриваемый подход известен под названием «аффинного мечения», или биоспецифической модификации (см. с. 172).

Наиболее эффективный метод идентификации функциональных групп активного центра — рентгеноструктурный анализ. На основе информации о пространственной структуре фермент-субстратного комплекса, взаиморасположении каталитических групп фермента и атакующей связи субстрата в ряде случаев удается расшифровать механизм действия фермента.

Причины высокой каталитической активности ферментов

Между ферментативным и химическим катализом принципиальных различий не существует; химические механизмы, лежащие в их основе, сходны. Доминирующей концепцией химического катализа является теория переходного состояния. Эта теория рассматривает только два состояния реагентов — исходное (основное) и переходное — наименее стабильную структуру, образующуюся в ходе реакции. На графике (рис. 94) переходному состоянию соответствует максимум энергии; в таком состоянии химические связи непрерывно разрываются и образуются. Катализатор ускоряет реакцию, снижая величину энергии переходного состояния (энергетический барьер).

Хотя механизмы химического и ферментативного катализа сходны, однако ферменты в условиях нормального давления в вод-

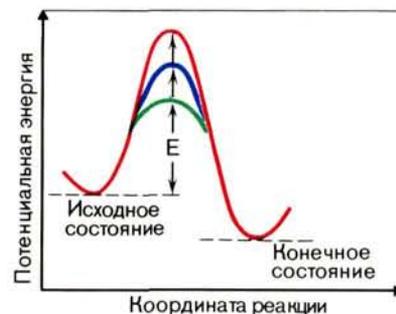


Рис. 94. Снижение энергии активации E при неферментативном и ферментативном катализе:

- некатализируемая реакция;
- неферментативный катализ;
- ферментативный катализ.

ных растворах при 37 °С являются значительно более эффективными, чем обычные химические катализаторы.

За счет чего достигается высокая каталитическая активность ферментов? Можно выделить несколько основных факторов, которые реализуются благодаря образованию фермент-субстратного комплекса: факторы сближения, фиксации и ориентации. В рамках теории переходного состояния эти факторы в конечном счете снижают энергетический барьер реакции. Связывание субстрата в активном центре обеспечивает сближение атакуемой связи с каталитическими группами фермента, одновременно достигается фиксация субстрата и его оптимальная для разрыва и образования химических связей ориентация. Кроме того, это фактор изменения конформаций фермента и субстрата. Д. Кошланд сформулировал концепцию «индуцированного соответствия», согласно которой при связывании специфического субстрата происходит такое изменение конформации фермента, которое перемещает каталитические группы в положение, обеспечивающее эффективное протекание катализа. Индуцируемые субстратом изменения конформации фермента происходят, вероятно, в пределах тех состояний, которые «разрешены» и для свободного фермента. Концепцию индуцированного соответствия можно рассматривать как развитие представлений Э. Фишера о жесткой матрице, действующей по принципу «ключ — замок».

Большое значение для эффективности действия фермента может иметь сопряженный кислотно-основный катализ, а также нуклеофильный катализ с образованием реакционноспособного промежуточного соединения. Немалую роль играет и фактор микросреды. Совокупность факторов, вносящих вклад в повышение каталитической активности ферментов, обеспечивает снижение энергетического барьера реакции. Согласно получившей весьма широкое признание концепции, снижение энергетического барьера достигается благодаря стабилизации переходного состояния или, точнее, благодаря приближению структуры субстрата в фермент-субстратном комплексе к структуре переходного состояния. Приближение к структуре переходного состояния требует в общем случае затраты энергии; согласно рассматриваемой концепции, необходимая энергия обеспечивается за счет части энергии связывания субстрата с ферментом.

Механизм действия ферментов

Раскрытие с помощью метода рентгеноструктурного анализа пространственного строения ряда ферментов явилось надежной основой для построения рациональных схем механизма их действия. В одних случаях эти схемы основываются почти целиком на анализе структуры фермент-субстратных комплексов в кристалле, а в других — используются также результаты исследований по химической модификации ферментов, кинетике катализируемых реакций и другие данные. Установление механизма действия ферментов имеет ключевое значение для раскрытия структурно-функциональных взаимосвязей во множестве биологически активных систем. В данном разделе приведены сведения о механизме действия ряда ферментов; они могут служить иллюстрацией используемых подходов.

Лизоцим. Лизоцим (КФ 3.2.1.17) обнаружен в различных тканях животных и растений, он находится, в частности, в слезной жид-

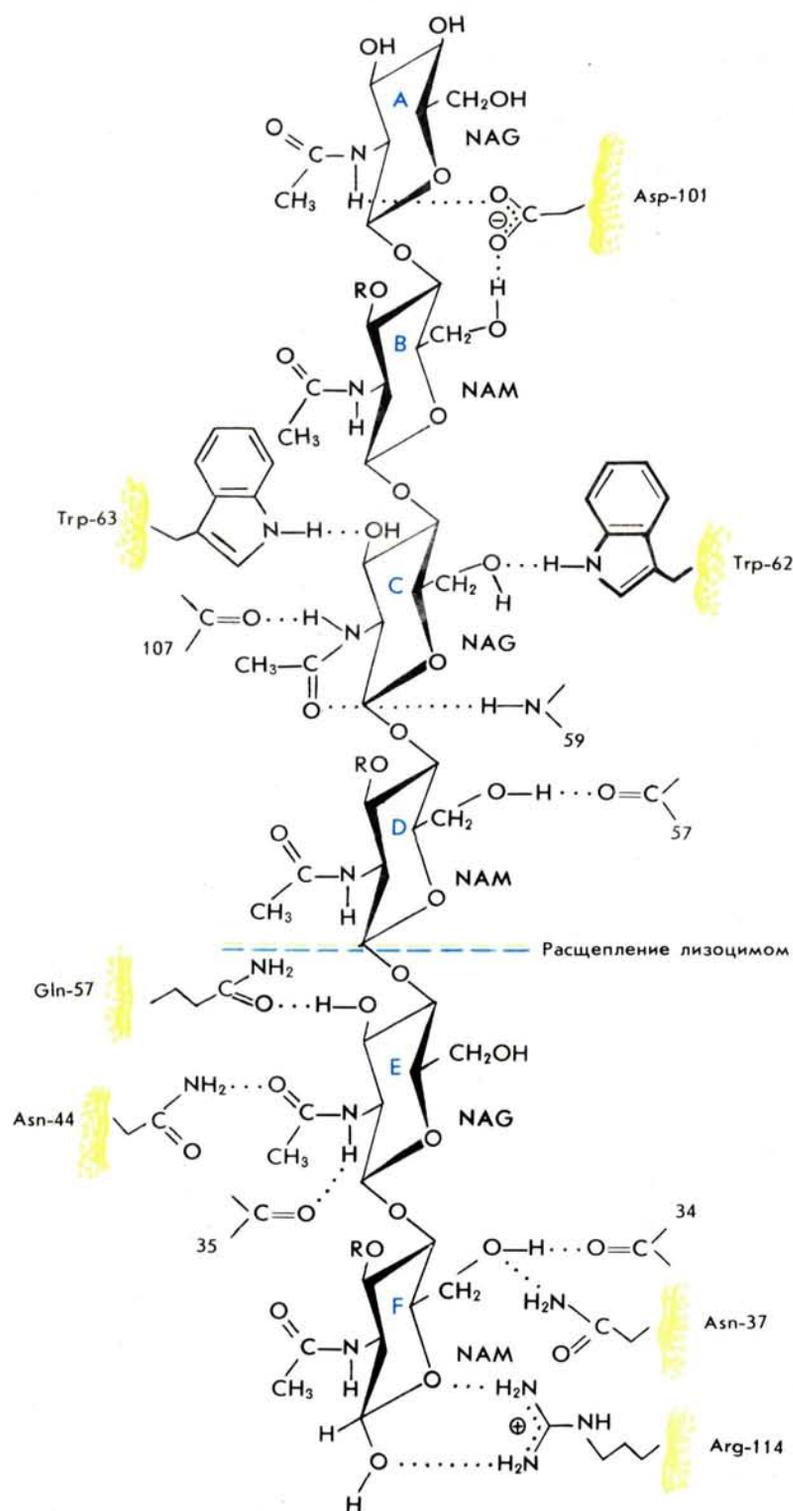


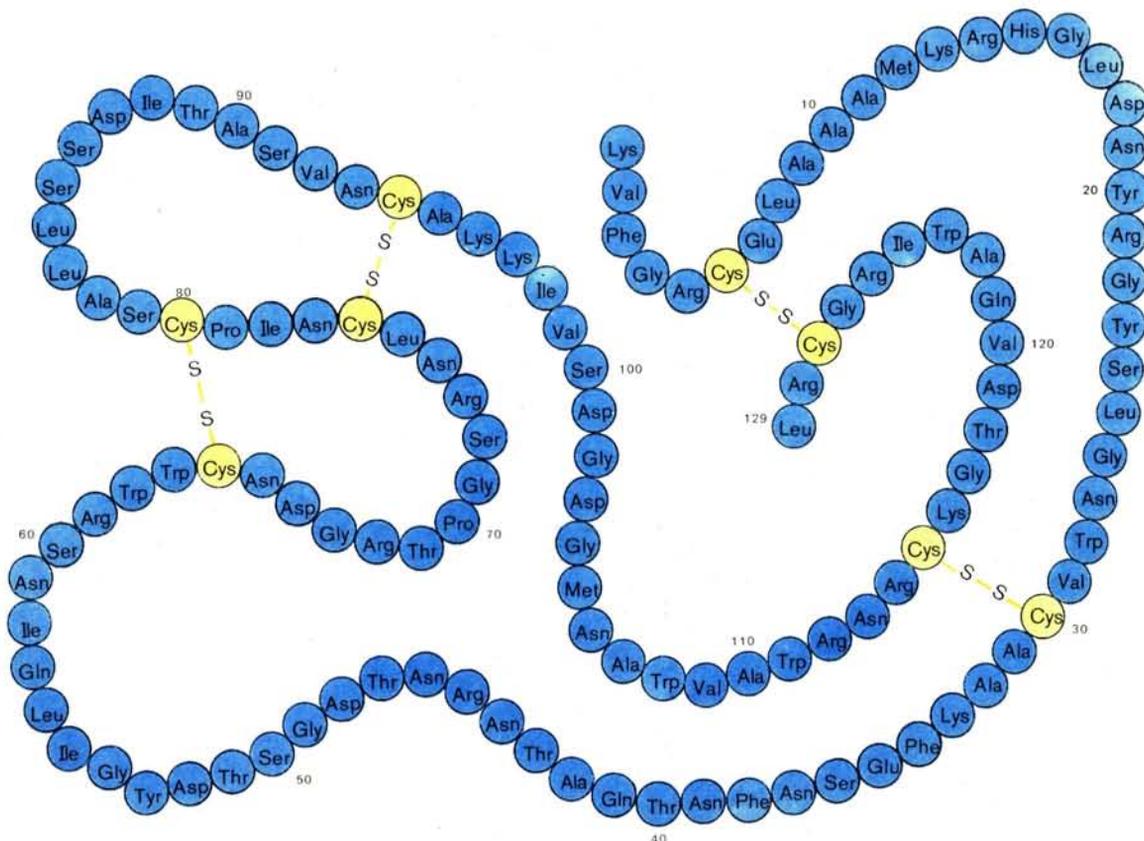
Рис. 95. Фрагмент структуры бактериального полисахарида — субстрата лизоцима. Показаны водородные связи, образующиеся при связывании субстрата в активном центре фермента.

кости и яичном белке. Лизоцим функционирует как антибактериальный агент, катализируя гидролиз полисахарида, входящего в состав клеточных стенок ряда бактерий. Этот полисахарид образован чередующимися остатками N-ацетилглюкозамина (NAG) и N-ацетилмурамовой кислоты (NAM), соединенными β -1,4-гликозидной связью (полисахаридные цепи сшиты короткими пептидными фрагментами) (рис. 95). Бактериальный полисахарид является весьма сложным нерастворимым соединением, в связи с чем в качестве субстратов лизоцима часто используются хорошо гидролизующиеся олигосахариды, образованные остатками NAG.

Лизоцим белка куриных яиц образован одной полипептидной цепью, содержащей 129 аминокислотных остатков; его молекулярная масса составляет 14 600. Первичная структура лизоцима определена Р. Кенфилдом и А. Лиу в 1965 г. (рис. 96). Высокая стабильность фермента обеспечивается наличием четырех дисульфидных мостиков.

Информация об активном центре и типе каталитического процесса была получена Д. Филлипсом и сотр. в 1965 г. на основе рентгеноструктурных исследований лизоцима (и его комплексов с ингибиторами). Молекула лизоцима имеет форму эллипсоида с осями $4,5 \times 3 \times 3$ нм; между двумя половинами молекулы находится «щель», в которой происходит связывание олигосахаридов. Стенки щели образованы в основном боковыми цепями неполярных аминокислот, обеспечивающими связывание неполярных структур субстрата, и включают также боковые цепи полярных аминокислот, которые

Рис. 96. Первичная структура лизоцима.



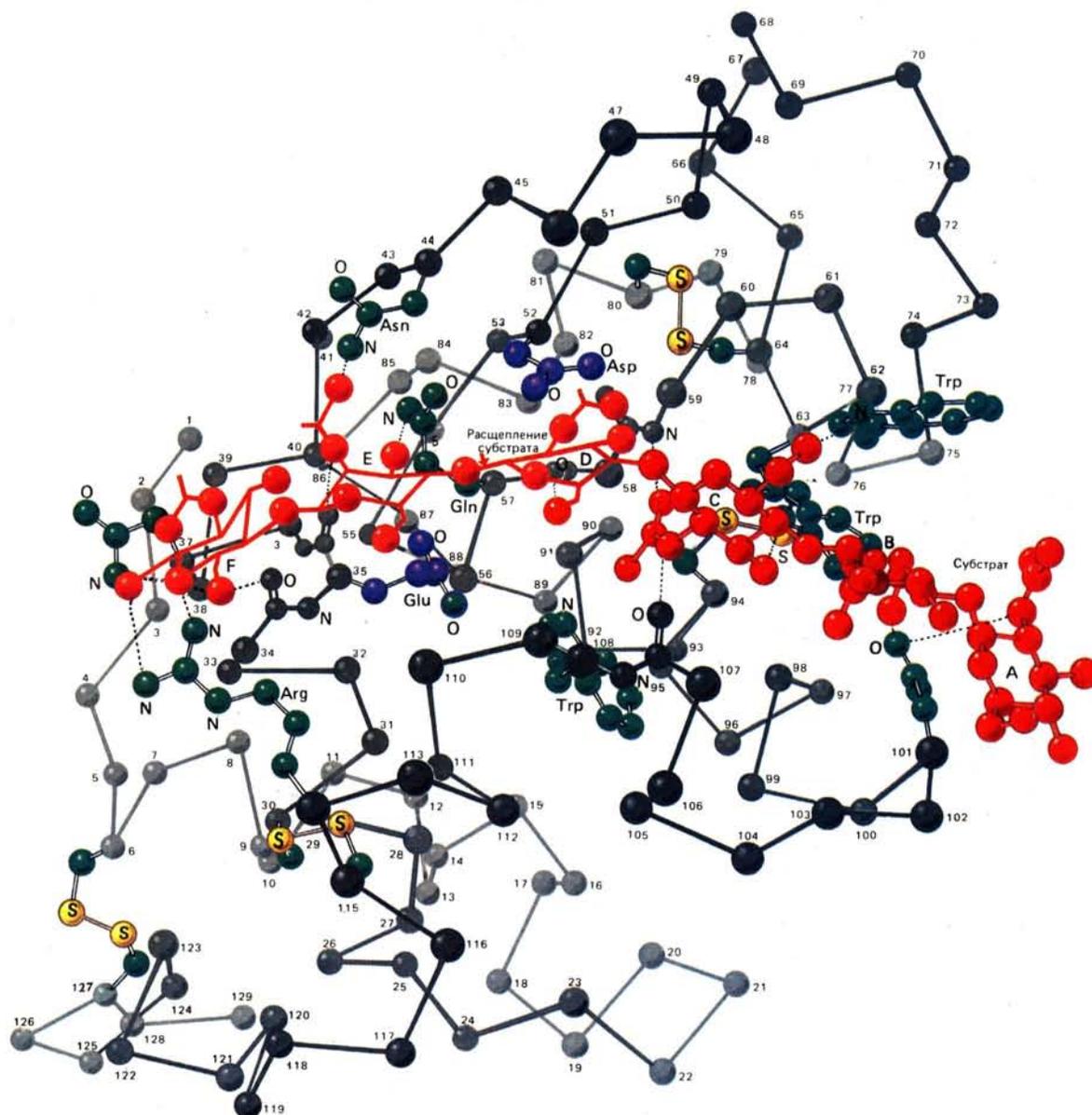
способны образовывать водородные связи с ациламинными и гидроксильными группами субстрата (рис. 95). Размер щели позволяет разместиться молекуле олигосахарида, содержащей 6 остатков моносахаридов. Это согласуется с результатами кинетических исследований, в соответствии с которыми скорость расщепления олигомеров NAG скачкообразно возрастает при переходе от тетрасахарида к соединениям, содержащим 5 или 6 моносахаридных остатков. Методом рентгеноструктурного анализа установить характер связывания субстрата, например гексасахарида NAG₆, не удается, поскольку он гидролизуется. В то же время комплексы фермента с ингибитором трисахаридом NAG₃ стабильны и хорошо изучены. NAG₃ связывается в щели на поверхности фермента, образуя водородные связи и ван-дер-ваальсовы контакты; при этом он заполняет только половину щели, в которой могут связаться еще три моносахаридных остатка (рис. 97). Невосстанавливающий конец (сахар А) оказывается у начала щели, а восстанавливающий конец (сахар С) — в центральной ее части; остатки сахаров А, В и С имеют конформацию кресла. Построение модели фермент-субстратного комплекса было основано на предположении о том, что при связывании субстрата NAG₆ реализуются те же взаимодействия, что и при связывании NAG₃. На модели фермента внутри щели были размещены еще три остатка сахара (обозначаемые как остатки D, E и F); каждый последующий сахар «присоединялся» таким образом, чтобы его конформация была такой же (насколько это возможно), как у первых трех сахаров. В составе модельного комплекса все остатки сахаров реализуют эффективные нековалентные взаимодействия с боковыми и пептидными группами аминокислотных остатков, образующих щель.

При идентификации каталитических групп естественно было сосредоточить внимание на тех из них, которые в фермент-субстратном комплексе находятся около расщепляемой гликозидной связи и могут служить донорами или акцепторами протонов. Оказалось, что по одну сторону от расщепляемой связи, на расстоянии $\approx 0,3$ нм (от кислорода гликозидной связи), находится карбоксильная группа Glu-35, а по другую (на таком же расстоянии) карбоксильная группа Asp-52 (рис. 97), окружение их сильно различается. Glu-35 окружена гидрофобными остатками; можно предполагать, что в оптимуме рН фермента эта группа находится в неионизированном состоянии. Окружение Asp-52 выражено полярное; ее карбоксильная группа участвует в качестве акцептора водорода в сложной сети водородных связей и функционирует, вероятно, в ионизированном состоянии.

Предложена следующая схема каталитического процесса при гидролизе олигосахарида (рис. 98). Неионизированная карбоксильная группа Glu-35 выступает в качестве донора протона, поставляя его гликозидному атому кислорода между атомом C₍₁₎ сахара D и C₍₄₎ сахара E (стадия общего кислотного катализа); это приводит к разрыву гликозидной связи. В результате остаток сахара D переходит в состояние карбокатиона с положительно заряженным атомом углерода C₍₁₎ и принимает конформацию полукресла. Отрицательный заряд карбоксилатной группы Asp-52 стабилизирует карбокатион. Остаток NAG₂ (сахара E + F) диффундирует из области активного центра. Затем в реакцию вступает молекула воды; ее протон переходит к Glu-35, а OH⁻-группа к атому C₍₁₎ остатка D (стадия общего основного катализа). Остаток NAG₄ (сахара D + C + B + A) уходит из области активного центра, и фермент возвращается в исходное состояние.

Рибонуклеаза. Рибонуклеаза (РНКаза) (КФ 3.1.4.22) поджелудочной железы быка гидролизует межнуклеотидные связи в РНК около пиримидиновых звеньев, которые при этом остаются этери-

Рис. 97. Модель комплекса лизоцима с субстратом NAG₆. Положение остатков сахаров А, В и С установлено методом рентгеноструктурного анализа.



фицированными по 3'-положению. Фермент наряду с другими нуклеазами широко используется при анализе структуры РНК.

РНКаза образована одной полипептидной цепью, содержащей 124 аминокислотных остатка, а ее молекулярная масса равна 13 680; в молекуле имеется четыре дисульфидных связи. РНКаза является первым ферментом, для которого была установлена первичная структура. В ходе этих исследований У. Стейн и С. Мур разработали современную методологию определения первичной структуры белков. В 1969 г. Р. Меррифилд с помощью твердофазного метода осуществил полный химический синтез каталитически активной РНКазы (см. с. 145).

На основании результатов исследования ренатурации рибонуклеазы (см. с. 105) К. Анфинсен впервые четко сформулировал пред-

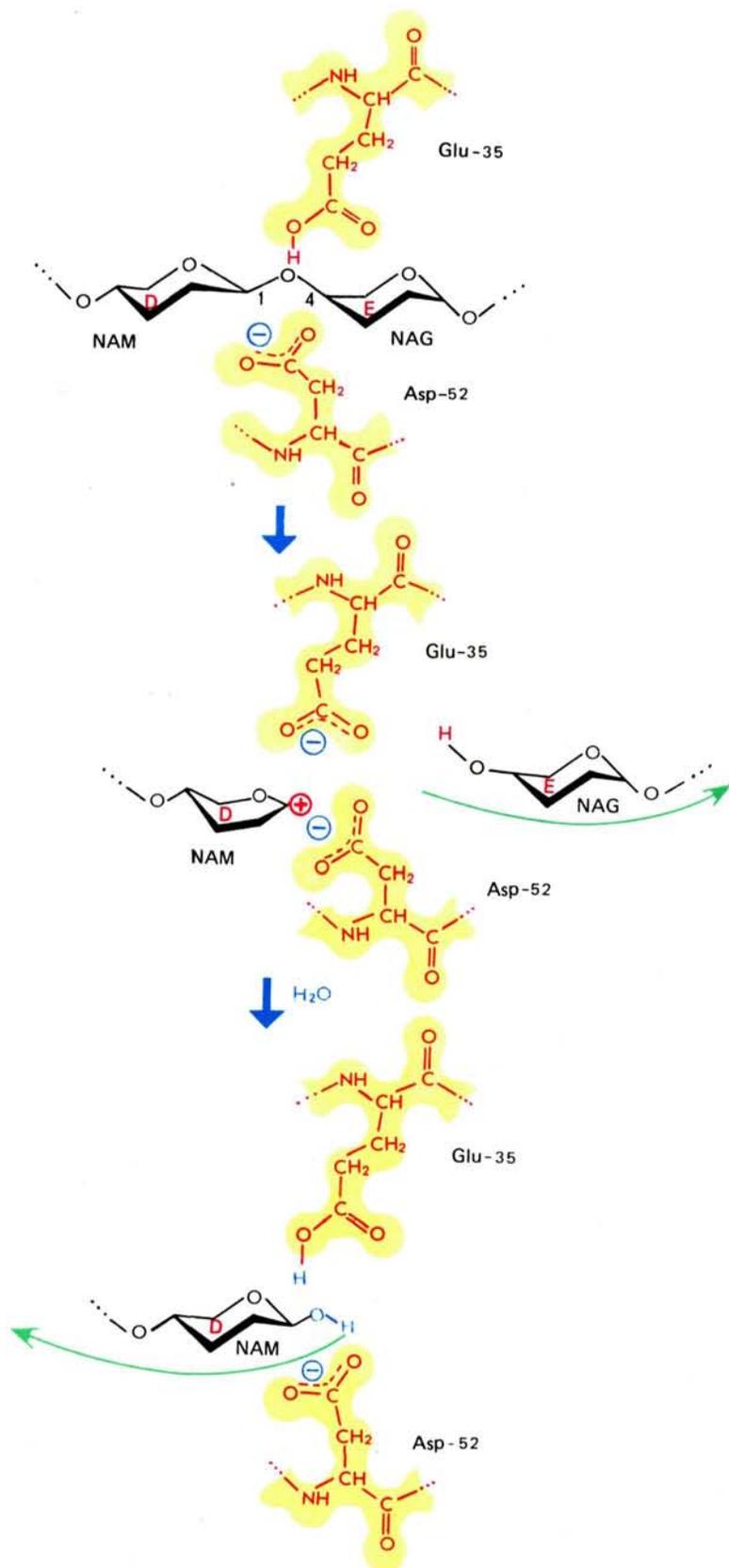
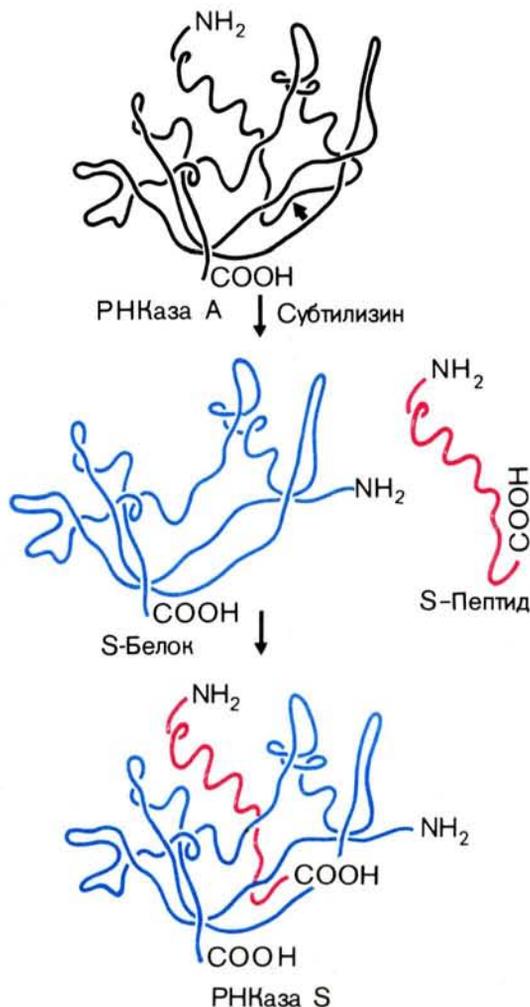


Рис. 98. Схема каталитического процесса при гидролизе олигосахарида лизоцимом.

ставление о том, что пространственное строение белка определяется его первичной структурой.

В 1958 г. Ф. Ричардс показал, что в определенных условиях субтилизин расщепляет в РНКазе пептидную связь Ala-20—Ser-21. Образующиеся фрагменты были названы S-пептидом (остатки 1—20) и S-белком (остатки 21—124); за счет нековалентных взаимодействий фрагменты образуют комплекс, названный РНКазой S. Этот комплекс обладает почти полной каталитической активностью нативного фермента; в изолированном виде S-пептид и S-белок неактивны. Далее было установлено, что синтетический пептид, идентичный по последовательности фрагменту S-пептида, содержащему остатки с 1 по 13, восстанавливает активность S-белка, однако более короткий пептид, содержащий остатки с 1 по 11, такой способностью не обладает. Полученные данные позволили сделать заключение о том, что соответствующие остатки His-12 или Met-13 (или оба этих остатка) входят в активный центр фермента.

При исследовании влияния pH на активность РНКазы была выяснена важная роль функциональных групп белка с рК 5,2 и 6,8; это позволяло предполагать участие в каталитическом акте



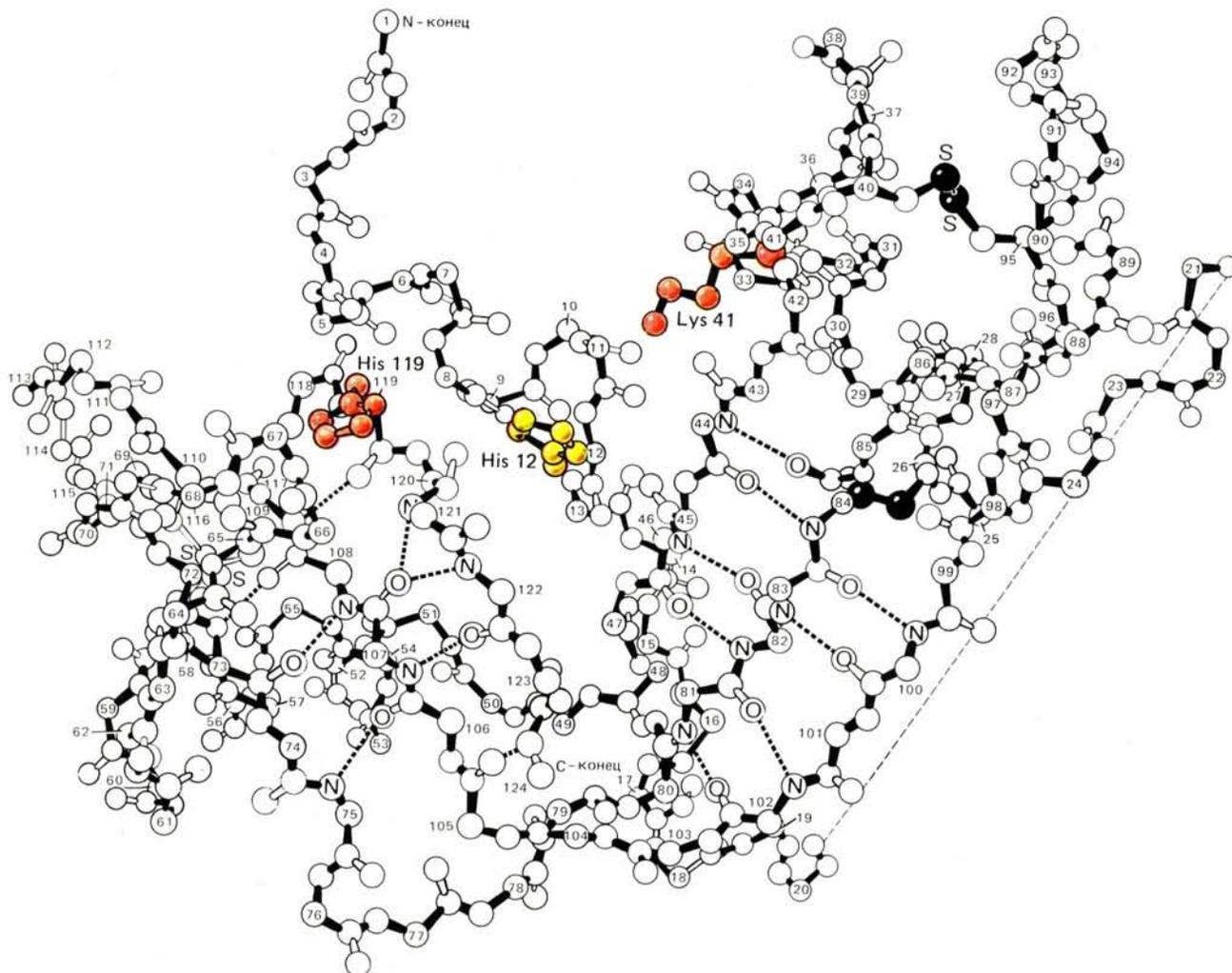
остатков гистидина. При карбоксиметилировании РНКазы иодацетатом при pH 5,5, т. е. в условиях, при которых преимущественно происходит модификация остатков гистидина, наблюдалась полная утрата активности; модифицированный фермент содержит 1 моль карбоксиметильных групп на 1 моль белка. В результате образуются две монокарбоксиметилированные формы фермента. В одной форме карбоксиметилированным является остаток His-12, а в другой — His-119. Преимущественно модифицировался His-119.

Эти данные позволяли предполагать, что остатки His-12 и His-119 находятся в активном центре и что модификация одного из них препятствует модификации другого.

В результате рентгеноструктурных исследований, проведенных Г. Уикофом и Ф. Ричардсом было выяснено пространственное строение РНКазы S и комплекса РНКазы S с ингибиторами. На рисунке 99 приведено строение РНКазы S. Видно, что молекула имеет форму почки, активный центр локализован в углублении, где находятся остатки His-12, His-119 и Lys-41.

Предполагаемая схема каталитического процесса, осуществляемого РНКазой, дана на рисунке 100. Гидролиз происходит в результате сопряженного действия остатков His-12 и His-119, осуществля-

Рис. 99. Строение рибонуклеазы S. Показано взаиморасположение His-12, His-119 и Lys-41 в активном центре.





Антонов Владимир Константинович (р. 1927), советский химик-биоорганик. Окончил Московский химико-технологический институт им. Д. И. Менделеева (1949), с 1959 г. работает в Институте биоорганической химии им. М. М. Шемякина АН СССР. Занимается изучением структуры и функции протеолитических ферментов. Автор книги «Химия протеолиза». Лауреат Государственной премии СССР (1984).

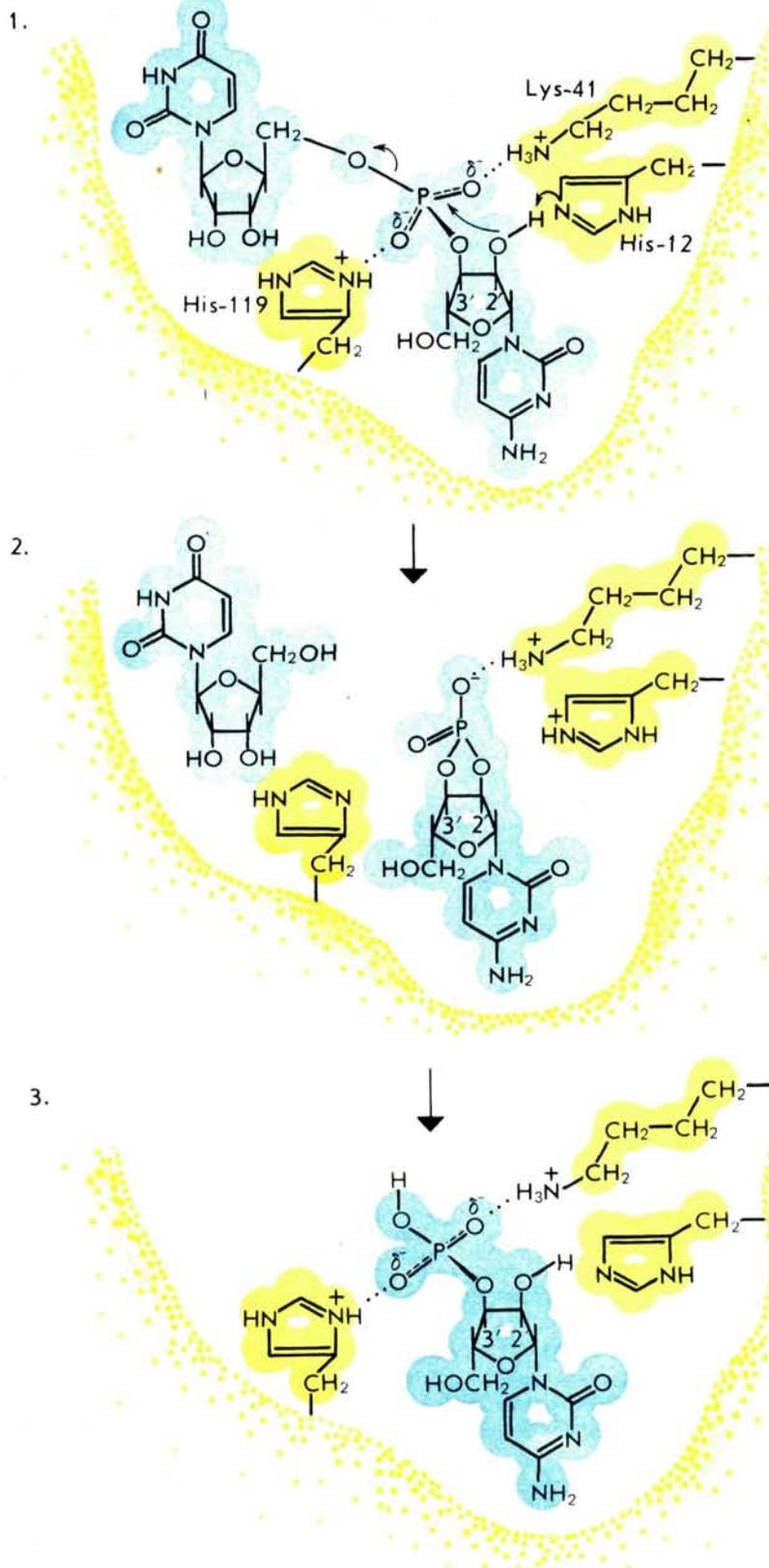


Рис. 100. Схема каталитического процесса, осуществляемого РНКазой.

ющих кислотно-основной катализ. На приведенной схеме указаны стадии каталитического процесса:

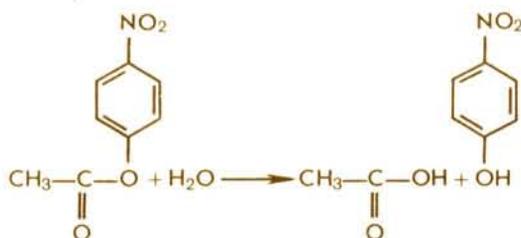
1. Субстрат находится в активном центре; His-12 и His-119, а также Lys-41 расположены около отрицательно заряженного фосфата.

2. В результате действия His-12 как основания, акцептирующего протон от 2'-ОН-группы рибозы, и His-119 как кислоты, отдающей протон атому кислорода фосфата, образуется сначала промежуточный комплекс, а затем 2',3'-циклический фосфат.

3. На место ушедшего продукта поступает вода, отдающая протон His-119, а OH^- — фосфату, одновременно протон от His-12 переходит к кислородному атому рибозы, образуется второй продукт, а фермент возвращается в исходное состояние.

Химотрипсин. Химотрипсин (КФ 3.4.21.1) секретируется в форме профермента — химотрипсиногена поджелудочной железой позвоночных животных; активация профермента происходит в двенадцатиперстной кишке под действием трипсина. Физиологическая функция химотрипсина — гидролиз белков и полипептидов. Химотрипсин атакует преимущественно пептидные связи, образованные карбоксильными группами остатков тирозина, триптофана, фенилаланина и метионина. Он эффективно гидролизует также сложные эфиры соответствующих аминокислот. Молекулярная масса химотрипсина равна 25 000, молекула его содержит 241 аминокислотный остаток. Химотрипсин образован тремя полипептидными цепями, которые связаны дисульфидными мостиками. Первичная структура фермента установлена Б. Хартли в 1964 г.

Функциональные группы активного центра химотрипсина идентифицированы с помощью необратимых ингибиторов. Остаток Ser-195 был модифицирован диизопропилфторфосфатом и фенилметилсульфофторидом, а остаток His-57 — N-тозил-L-фенилаланил-хлорметилкетонем (см. рис. 89 и с. 171). Двухстадийность процесса химотрипсинового гидролиза была обнаружена при изучении кинетики гидролиза п-нитрофенилацетата.



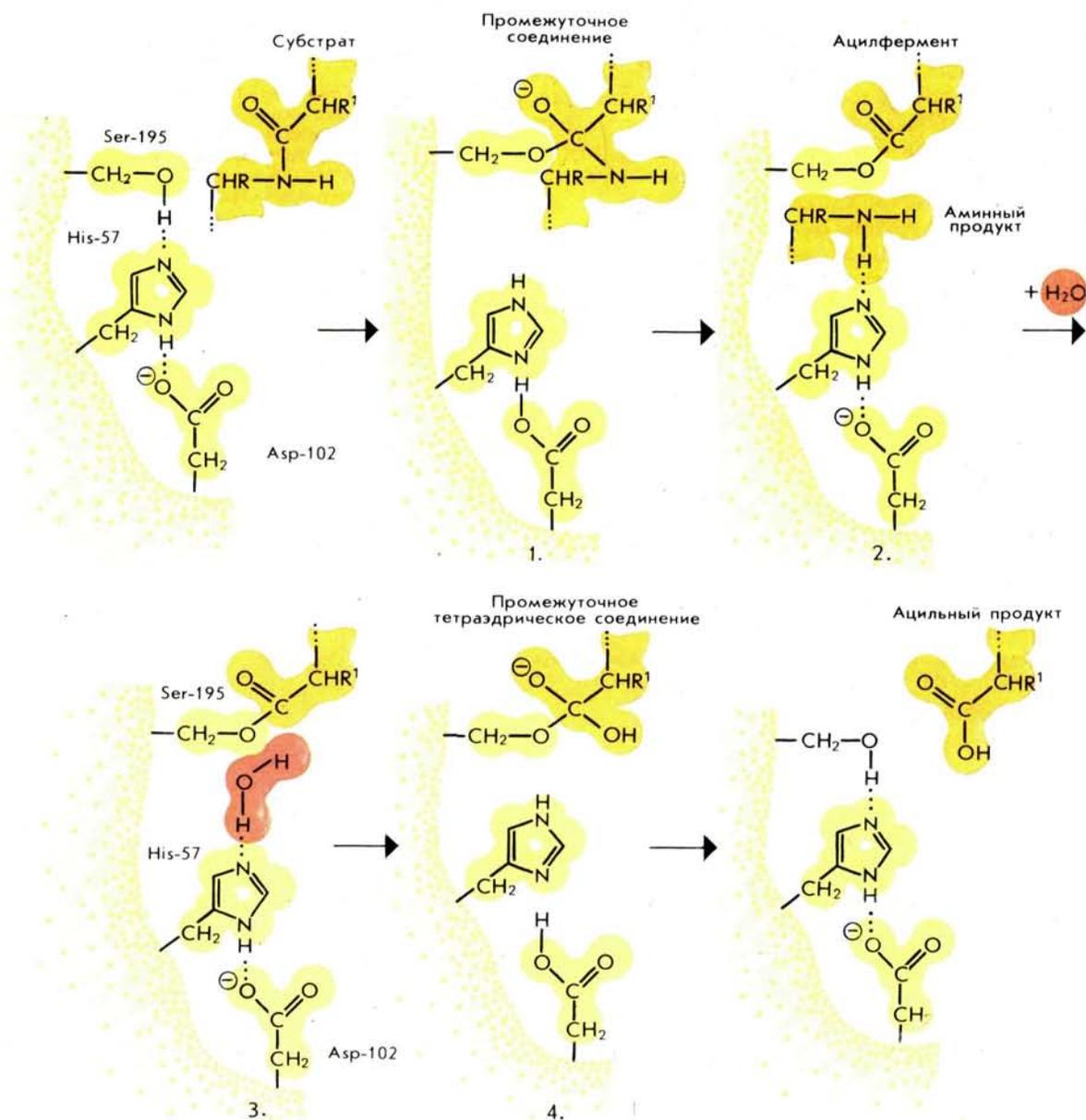
Блоу (Blow) Дэвид Мервин (р. 1931), английский биофизик. Окончил Кембриджский университет, с 1977 г. — профессор Имперского колледжа науки и технологии в Лондоне. Основные работы — по выяснению пространственной структуры белков методом рентгеноструктурного анализа.

Характерной чертой рассматриваемого процесса является образование ковалентного интермедиата — ацилфермента. Ацилируемая каталитическая группа была идентифицирована — остаток Ser-195. Механизм катализа, осуществляемого ферментом, был предложен еще до установления пространственной структуры белка, но позднее был уточнен. В частности, исследования с помощью $^{18}\text{H}_2\text{O}$ позволили доказать образование ацилфермента при гидролизе пептидов (В. К. Антонов).

Трехмерная структура химотрипсина с разрешением 0,2 нм была установлена методом рентгеноструктурного анализа Д. Блоу и сотр.

в 1976 г. Молекула имеет форму эллипсоида с осями $5,4 \times 4,0 \times 4,0$ нм. Результаты кристаллографических исследований подтвердили предположение о том, что остатки Ser-195 и His-57 сближены. На рисунке 101 показан активный центр химотрипсина с фрагментом связанного субстрата. Гидроксильная группа Ser-195 находится на расстоянии 0,3 нм от атома азота имидазольного кольца His-57. Наиболее интересным оказалось то обстоятельство, что атом азота в положении 1 кольца находится на расстоянии $\approx 0,28$ нм от атома кислорода карбоксильной группы боковой цепи Asp-102 и занимает положение, благоприятное для образования водородной связи. Следует отметить, что химические исследования не могли выявить участия Asp-102 в функционировании активного центра, поскольку этот остаток погружен внутрь молекулы. В настоящее время счи-

Рис. 101. Схема каталитического процесса, осуществляемого химотрипсином.

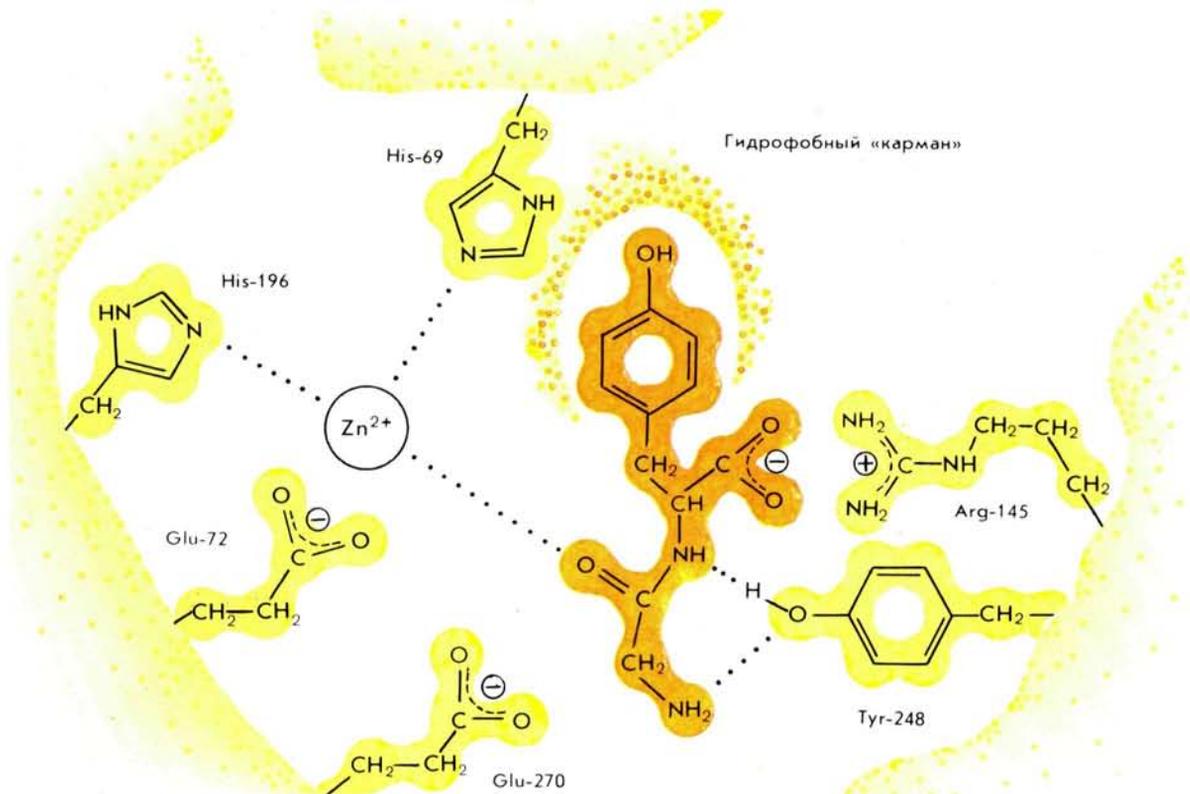


тается, что три остатка Asp-102, His-57 и Ser-195 образуют систему переноса заряда, которая играет решающую роль в процессе катализа. Функционирование системы обеспечивает эффективное участие His-57 в катализе в качестве кислотно-основного катализатора и повышает реакционную способность Ser-195 как нуклеофила. В процессе каталитического акта происходит приближение кислородного атома Ser-195 к карбоксильному углероду атакуемой связи.

Схема каталитического процесса приведена на рисунке 101. Ключевым элементом является перенос протона от Ser-195 к His-57. Одновременно происходит атака атомом кислорода серина карбонильного атома углерода субстрата с образованием сначала промежуточного тетраэдрического соединения (1), а затем ацилфермента (2). На следующей стадии происходит деацилирование. Молекула воды занимает в активном центре место ушедшего аминного продукта (3). Протон от молекулы воды поступает в систему переноса заряда, а ион OH^- одновременно атакует карбонильный атом углерода ацильной группы ацилфермента. Как и на стадии ацилирования, образуется промежуточное тетраэдрическое соединение (4). Затем His-57 поставляет протон атому кислорода Ser-195, в результате чего освобождается ацильный продукт; он диффундирует в раствор, а фермент возвращается в исходное состояние.

Карбоксипептидаза А. Карбоксипептидаза А (КФ 3.4.12.2) секретируется в виде профермента поджелудочной железой позвоночных животных. Образование активного фермента происходит

Рис. 102. Строение комплекса карбоксипептидазы А с дипептидом Gly—Tyr.



в тонком кишечнике при участии химотрипсина. Фермент последовательно отщепляет от пептидной цепи остатки С-концевых аминокислот, т. е. является экзопептидазой.

Карбоксипептидаза А образована одиночной полипептидной цепью, содержащей 307 аминокислотных остатков; молекулярная масса ее равна 34 470. Аминокислотная последовательность белка была установлена в 1969 г. Р. Брэдшоу и сотр.

Выяснение механизма действия фермента оказалось возможным только после проведения рентгеноструктурных исследований. Про-

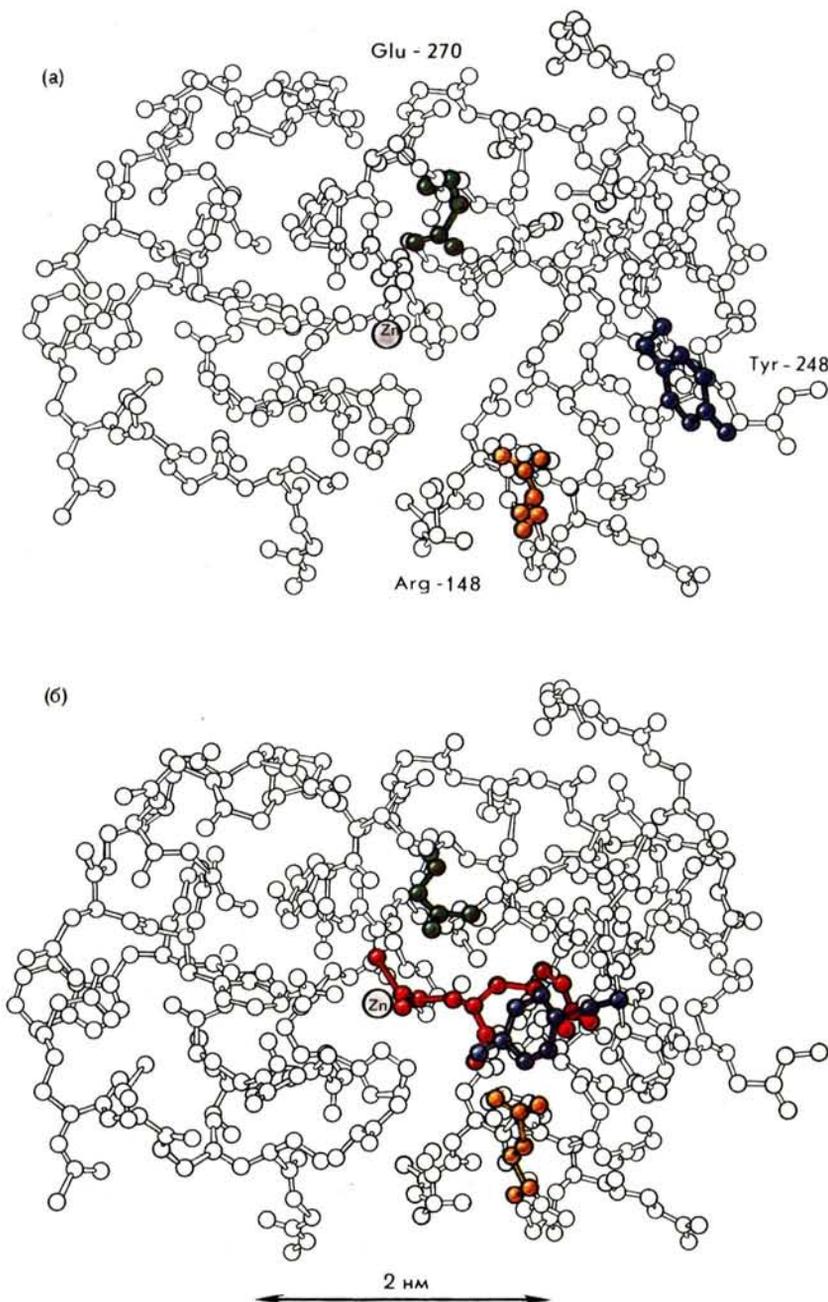
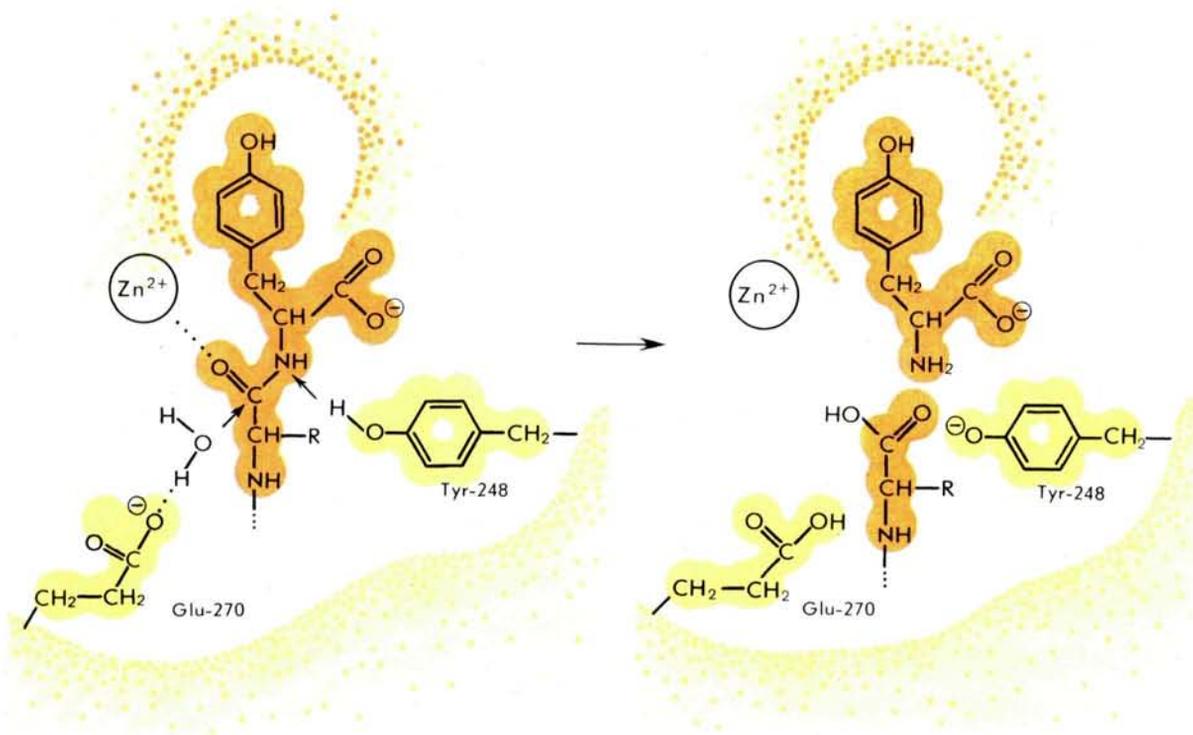


Рис. 103. Изменения в структуре карбоксипептидазы А при связывании с субстратом:

(а) — фермент;

(б) — фермент-субстратный комплекс. (На рисунке представлена только часть молекулы фермента.)

пространственная структура фермента и его комплекса с дипептидом Gly-Тур (модель субстрата) была установлена (с разрешением 0,2 нм) У. Липскомбом и сотр. в 1967 г. Молекула фермента имеет форму эллипсоида с осями $5,0 \times 4,2 \times 3,8$ нм; активный центр находится в углублении, переходящем в глубокий неполярный карман. В зоне активного центра локализован ион цинка (его лигандами являются боковые цепи остатков Glu-72, His-196, His-69 и молекула воды), а также функциональные группы, участвующие в связывании субстрата и катализе,— остатки Arg-145, Glu-270 и Тур-248



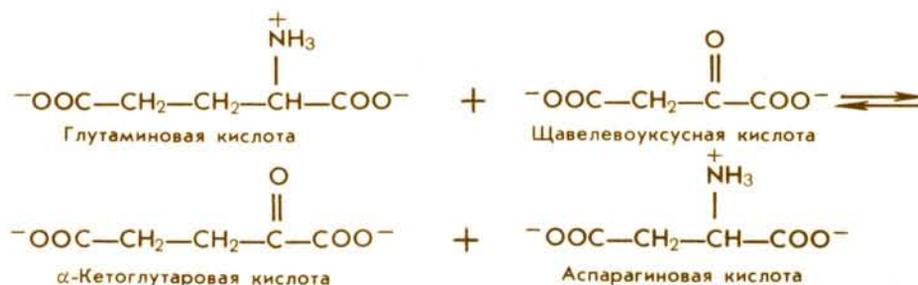
(рис. 102). При сравнительном анализе структур фермента и его комплекса с Gly—Тур была получена важная информация о строении фермент-субстратного комплекса (рис. 103). В частности, установлено, что при образовании комплекса гидроксильная группа Тур-248 перемещается на 1,2 нм по отношению к своему положению в свободном ферменте (т. е. примерно на $1/3$ диаметра молекулы).

Схема каталитического процесса, осуществляемого карбоксипептидазой А, предложена У. Липскомбом на основании данных рентгеноструктурных исследований. Согласно этой схеме (рис. 104), карбоксилатная группа Glu-270 активирует молекулу воды, находящуюся в сфере реакции, оттягивая от нее протон; образующийся ион OH^- осуществляет нуклеофильную атаку на карбонильный углерод расщепляемой связи. Одновременно гидроксильная группа Тур-248, находящаяся около атома азота расщепляемой пептидной связи, отдает ему протон. В результате атакуемая пептидная связь

Рис. 104. Схема каталитического процесса, осуществляемого карбоксипептидазой А.

расщепляется и образующиеся продукты уходят из зоны активного центра. Приведенная схема иллюстрирует общий основной катализ.

Аспартатаминотрансфераза. Аспартатаминотрансфераза (КФ 2.6.1.1) (ААТ) катализирует обратимую реакцию трансминирования:



Ферментативная реакция трансминирования была открыта А. Е. Браунштейном и М. Г. Крицман в 1937 г. при изучении ферментного препарата из мышцы голубя. В последующих исследованиях было показано, что реакции трансминирования широко распространены в живой природе и играют важную роль в сопряжении азотистого и энергетического обмена.

В 1945 г. было установлено, что пиридоксаль-5'-фосфат (ПЛФ) является коферментом аминотрансфераз. Молекула ААТ является димером, образованным идентичными субъединицами. В сердечной мышце исследованных позвоночных имеются два изофермента — цитоплазматическая (цААТ) и митохондриальная (мААТ) аминотрансферазы.

Первичная структура цитоплазматической аминотрансферазы из сердечной мышцы свиньи была установлена в 1972 г. Ю. А. Овчинниковым, А. Е. Браунштейном и сотр. Полипептидная цепь белка

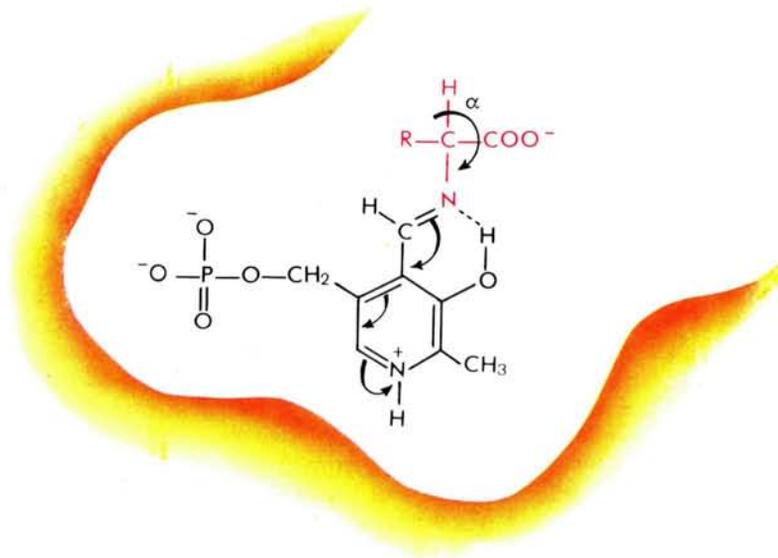


Рис. 105. Смещение электронов к атому азота кофермента по теории А. Е. Браунштейна и М. М. Шемякина.

содержит 412 аминокислотных остатков; молекулярная масса равна 46 000.

Общая теория пиридоксалевого катализа была разработана А. Е. Браунштейном и М. М. Шемякиным в 1952 — 1953 гг., а несколько позднее — Д. Е. Мецлером и Е. Е. Снеллом. Согласно этой теории, каталитическое действие пиридоксальных ферментов

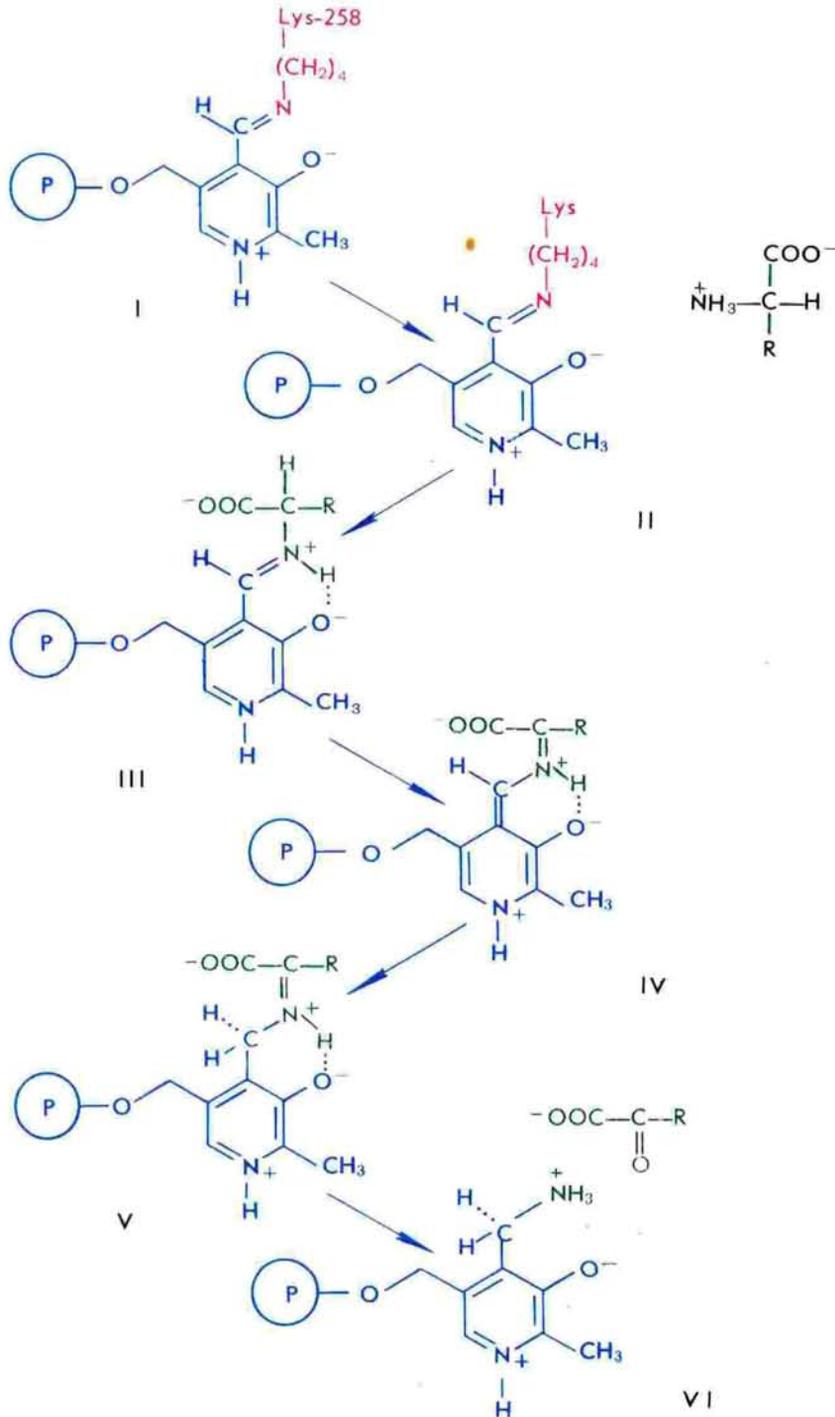


Рис. 106. Стадии ферментативного транс-аминирования.



Браунштейн Александр Евсеевич (1902—1986), советский биохимик, академик АН СССР (1964) и АМН СССР (1945). Окончил Харьковский медицинский институт (1925). Основные труды посвящены химии ферментов и обмену аминокислот. Открыл реакцию переаминирования и обосновал ее роль в азотистом обмене. Предложил (1952, совместно с М. М. Шемякиным) общую теорию действия пиридоксальных ферментов. Лауреат Ленинской (1980) и Государственной (1941) премий СССР. Герой Социалистического Труда (1972).

обусловлено способностью альдегидной группы пиридоксальфосфата образовывать при взаимодействии с аминами, в том числе с аминокислотами, альдимины (шиффовы основания) (рис. 105). В образующейся фосфопиридоксиленаминокислоте имеется система сопряженных двойных связей, по которой происходит смещение электронов от α -углеродного атома аминокислоты к электрофильному атому азота пиридинового кольца кофермента. Понижение электронной плотности у α -углеродного атома облегчает разрыв связей, образованных этим атомом.

Современные представления о механизме ферментативного трансаминирования, разработанные А. Е. Браунштейном и его сотрудниками, являются развитием рассмотренной выше теории (рис. 106). В исходном состоянии альдегидная группа пиридоксальфосфата образует альдиминную связь с ϵ -аминогруппой остатка Lys-258 активного центра (I). При связывании аминокислоты образуется комплекс Михаэлиса (II), а затем альдимин между пиридоксальфосфатом и субстратом (III). В результате последующих

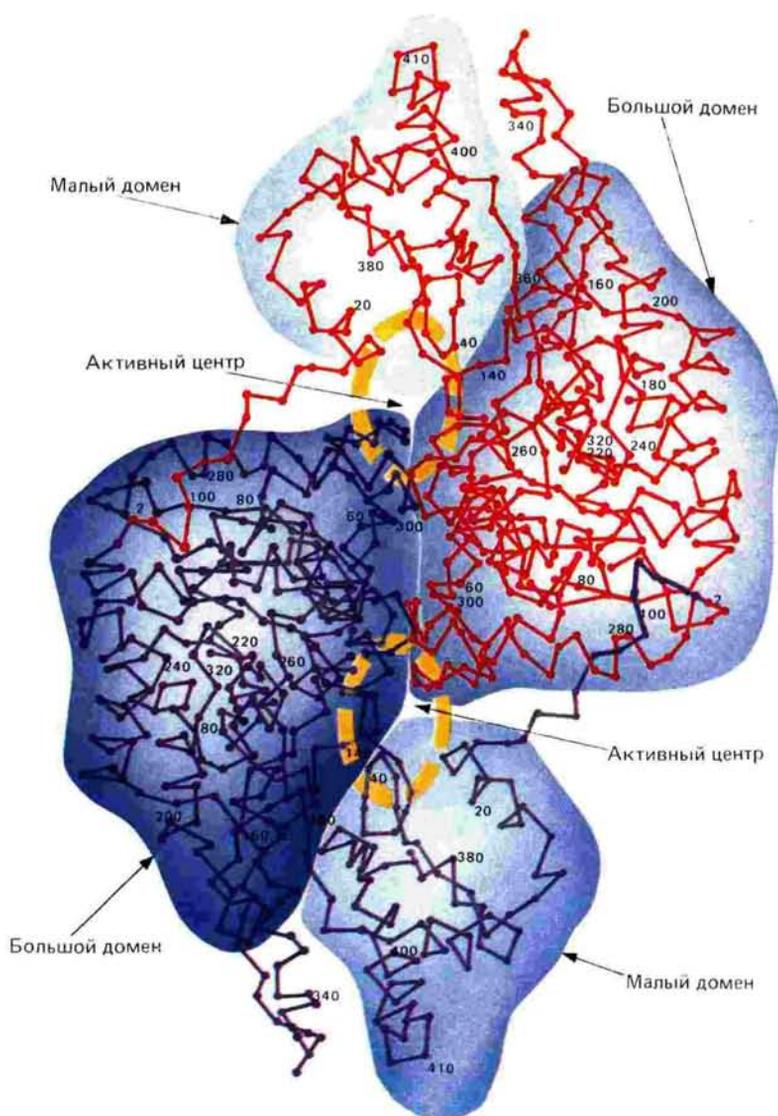


Рис. 107. Пространственное строение аспаратаминотрансферазы.

превращений через промежуточные стадии (IV) и (V) образуется оксокислота (VI). Этим заканчивается первая полуреакция трансаминирования. Повторение тех же стадий в «обратном направлении» с новой оксокислотой составляет вторую полуреакцию, завершающую каталитический цикл трансаминирования.

В результате рентгеноструктурного исследования кристаллов цААТ (из сердечной мышцы кур) установлена пространственная структура фермента с разрешением 0,28 нм (А. Е. Браунштейн, Б. К. Вайнштейн и сотр.). Определен участок связывания пиридоксальфосфата: он расположен в широком углублении на поверхности белка вблизи участка контакта субъединиц (рис. 107).

Миоглобин и гемоглобин. Эти два белка часто называют дыхательными ферментами. Взаимодействие их с субстратом — кислородом выяснено детально, прежде всего на основе рентгеноструктурного анализа высокого разрешения. Трехмерная структура миоглобина была определена Дж. Кендрию в 1961 г., а трехмерная структура гемоглобина — М. Перутцем в 1960 г. Молекула миоглобина име-

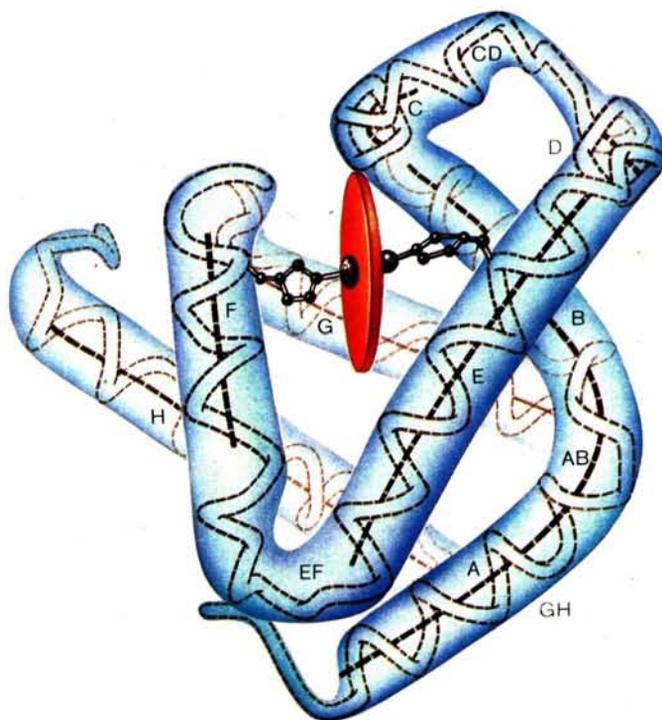


Рис. 108. Модель структуры миоглобина.

ет компактную форму — $4,5 \times 3,5 \times 2,5$ нм (рис. 108), полипептидная цепь образует 8 спирализованных участков, обозначаемых буквами от А до Н. Она специфическим образом уложена вокруг большого плоского железосодержащего кольца гема. Гем — это комплекс порфирина с двухвалентным железом.

Структура протопорфирина IX, входящего в состав гема миоглобина и гемоглобина, представлена на рисунке 109. Полярные цепи пропионовой кислоты гема находятся на поверхности молекулы,

остальная часть гема погружена в глобулу. Связь гема с белком осуществляется за счет координационной связи между атомом железа и атомом азота гистидина, локализованного в спирали F; это так называемый проксимальный гистидин (рис. 110). В гемовом кармане в составе спирали E локализован другой важный остаток гистидина — дистальный гистидин; он находится с противоположной стороны от атома железа на большем расстоянии, чем проксимальный гистидин. Область между железом гема и дистальным гистидином в дезоксимиоглобине свободна, и липофильная молекула O_2 может связываться с железом, занимая шестое координационное положение. Уникальной особенностью миоглобина, а также гемоглобина является их способность обратимо связывать O_2 без окисления гемового Fe^{2+} в Fe^{3+} . Это оказывается возможным, поскольку в гидрофобном гемовом кармане, из которого вытеснена вода, создается среда с низкой диэлектрической проницаемостью.

Рис. 109. Структура протопорфина IX.

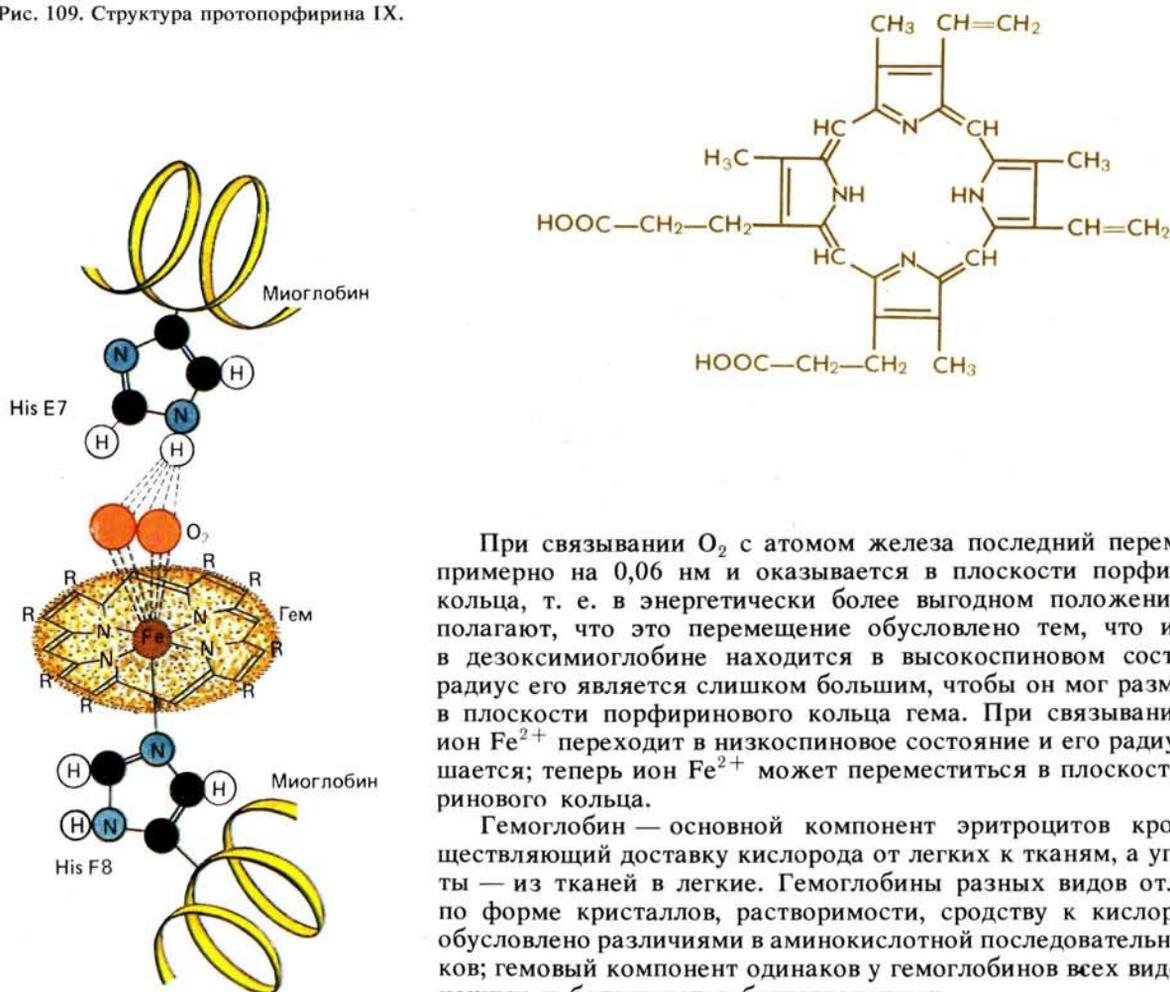


Рис. 110. Зона участка связывания кислорода в миоглобине. Показаны гем, проксимальный гистидин (F8) и дистальный гистидин (E7).

При связывании O_2 с атомом железа последний перемещается примерно на 0,06 нм и оказывается в плоскости порфиринового кольца, т. е. в энергетически более выгодном положении. Предполагают, что это перемещение обусловлено тем, что ион Fe^{2+} в дезоксимиоглобине находится в высокоспиновом состоянии и радиус его является слишком большим, чтобы он мог разместиться в плоскости порфиринового кольца гема. При связывании же O_2 ион Fe^{2+} переходит в низкоспиновое состояние и его радиус уменьшается; теперь ион Fe^{2+} может переместиться в плоскость порфиринового кольца.

Гемоглобин — основной компонент эритроцитов крови, осуществляющий доставку кислорода от легких к тканям, а углекислоты — из тканей в легкие. Гемоглобины разных видов отличаются по форме кристаллов, растворимости, сродству к кислороду. Это обусловлено различиями в аминокислотной последовательности белков; гемовый компонент одинаков у гемоглобинов всех видов позвоночных и большинства беспозвоночных.

Гемоглобин человека представляет собой тетрамер, состоящий из четырех субъединиц: двух α -субъединиц и двух β -субъединиц, содержащих по 141 и 146 аминокислотных остатков соответственно. Между первичными структурами α - и β -субъединиц существует зна-

чительная гомология, сходны также и конформации их полипептидных цепей.

Молекула гемоглобина имеет сферическую форму, диаметр которой равен 5,5 нм (рис. 111). Четыре субъединицы упакованы в форме тетраэдра.

Какие структурные изменения происходят в гемоглобине при связывании кислорода? Данные рентгеноструктурного анализа показали, что оксигенирование гемоглобина сопровождается рядом изменений. При низком разрешении установлено, что в этом случае структура становится более компактной (атомы Fe β -цепей сближаются примерно на 0,6 — 0,7 нм), субъединицы поворачиваются друг относительно друга и оси второго порядка приблизительно на 10 — 15°. Результаты исследования при высоком разрешении свидетельствуют о том, что особенно значительные изменения происходят в области $\alpha\beta$ -контактов.

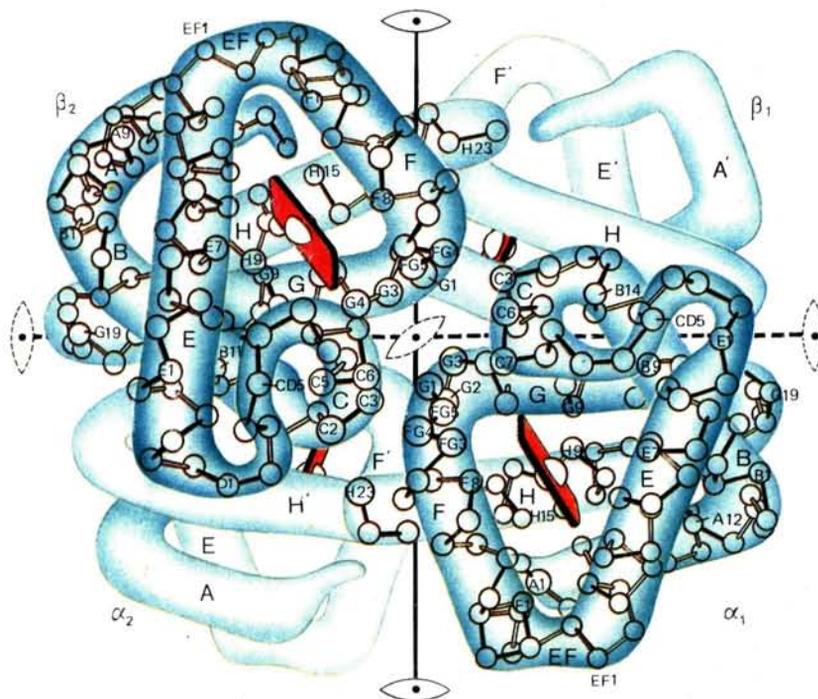


Рис. 111. Модель оксигемоглобина.

К настоящему времени на основе рентгеноструктурных исследований и ряда других методических подходов достигнуты значительные успехи в выяснении механизма действия ферментов. Исходя из сложившихся предпосылок, можно полагать, что в ближайшие годы развитие энзимологии будет идти в основном по пути получения модифицированных ферментов с заданными свойствами на основе достижений в области генной инженерии. Это открывает широкие возможности для проверки справедливости современных представлений о механизме действия ферментов и создания фундаментальной теории ферментативного катализа.

Защитные белки

Защитные белки — название в известной мере условное. В эту группу включены некоторые наиболее изученные белковые вещества, участвующие в проявлении защитных реакций организма. Основу их составляют белки иммунной системы (иммуноглобулины, антигены тканевой совместимости, интерлейкины, интерфероны и т. п.). В этом же разделе рассматриваются и белки системы свертывания крови.

Белки иммунной системы

Одним из условий существования живых организмов является наличие механизмов, позволяющих противостоять широкому кругу неблагоприятных факторов внешней среды, в том числе биологического происхождения. К таким факторам следует отнести прежде всего бактерии, вирусы и простейшие, являющиеся возбудителями инфекционных болезней. В процессе жизнедеятельности существует также опасность возникновения и накопления нежелательных соматических мутаций (злокачественное перерождение и т. п.), что может приводить к гибели организма. Несмотря на существенные различия в происхождении этих факторов у них есть одна общая особенность — они генетически чужды организму. Именно эта особенность чужеродных факторов обусловила появление универсального, эволюционно сформировавшегося механизма защиты — иммунитета.

В этой связи следует упомянуть также о проблеме вакцин, т. е. об искусственном внесении чужеродных клеток или веществ (как правило, белковой или углеводной природы) с целью стимуляции защиты против организмов, построенных из аналогичных клеток или веществ. При этом в последние годы появились методы создания чисто искусственных вакцин, получаемых химическим синтезом.

Итак, *иммунитет* — это врожденная, наследуемая способность организма распознавать и обезвреживать чужеродный материал, поступивший извне или образовавшийся в результате патологического процесса.

Иммунная система человека и животных (позвоночных) высокоспециализирована и достаточно сложна. По своей значимости она сравнима с нервной системой. Основными органами иммунной системы человека являются костный мозг, лимфатические узлы, селезенка и тимус (зобная железа), которые связаны в функционально единое целое системами лимфо- и кровообращения. Общий вес клеток иммунной системы человека — около 1 кг (рис. 112).

Исторический очерк. Иммунология возникла как наука о невосприимчивости высших организмов к инфекционным заболеваниям. Почти за 100 лет до ее рождения английский врач Э. Дженнер подметил, что люди, заражавшиеся «коровьей» оспой, невосприимчивы к оспе «человеческой». В 1788 г. им была опубликована работа, доказавшая, что искусственная прививка «коровьей» оспы надежно предохраняет от заболевания «черной заразой». Предложенный Э. Дженнером метод вакцинации против оспы уже в XVIII в. был принят повсеместно. Однако эра современной иммунологии началась с работ Л. Пастера, доказавшего, что инфекционные болезни

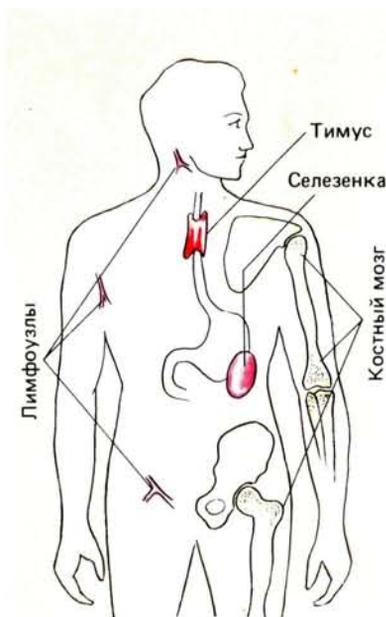


Рис. 112. Основные органы иммунной системы.

вызываются микроорганизмами. В 1881 г. им был предложен общий принцип иммунной защиты — предохранительные прививки путем заблаговременного введения ослабленных возбудителей. Вакцинация ослабленными или убитыми возбудителями для профилактики опаснейших заболеваний (полиомиелита, дифтерита, кори и т. д.) сохранила свое первоначальное значение до настоящего времени. В последние годы все большие усилия направляются на создание искусственных вакцин, получаемых генно-инженерным путем или химическим синтезом и моделирующих биополимеры поверхностной оболочки возбудителя. Их преимущество заключается в полной безопасности для вакцинируемого, а также зачастую в большей доступности. Работы в этом направлении, начатые израильским ученым М. Села, ведутся во всем мире. В СССР исследования, направленные на создание синтетических вакцин, успешно развиваются в лабораториях Р. В. Петрова и В. Т. Иванова.

Творцом клеточной теории иммунитета является И. И. Мечников, который в 1884 г. опубликовал работу о свойствах фагоцитов и роли этих клеток в невосприимчивости организмов к бактериальным инфекциям. Практически одновременно возникла так называемая гуморальная теория иммунитета, независимо развивавшаяся группой европейских ученых. Сторонники этой теории объясняли невосприимчивость тем, что бактерии вызывают образование в крови и других жидкостях организма специальных веществ, приводящих к гибели бактерий при их повторном попадании в организм. В 1901 г. П. Эрлих, проанализировав и обобщив данные, накопленные «гуморальным» направлением, создает теорию образования антител. Многие годы ожесточенной полемики И. И. Мечникова с группой крупнейших микробиологов того времени привели к всесторонней проверке обеих теорий и их полному подтверждению. В 1908 г. Нобелевская премия по медицине присуждается И. И. Мечникову и П. Эрлиху как создателям общей теории иммунитета.

Работами П. Медавара, начатыми в конце второй мировой войны, было доказано, что отторжение гетеротрансплантата при пересадке тканей и органов относится к функциям иммунитета, в результате чего сложилось более широкое понимание роли иммунной системы. В 1950 г. Ф. Бернет формулирует главную функцию иммунитета как распознавание «своего» и «чужого», причем чужими считаются все клетки и молекулы, генетически не идентичные данному организму.

Один из центральных вопросов иммунологии — каким образом организм включает биосинтез антител определенной специфичности, комплементарных введенному антигену, — был решен Ф. Бернетом, разработавшим так называемую теорию клональной селекции. Согласно этой теории, существует множество клонов лимфоцитов, каждый из которых несет на своей поверхности рецептор уникальной специфичности. Попадающий в организм антиген связывается с комплементарным ему рецептором, в результате чего клеточный клон размножается и начинает секретировать антитела той специфичности, которую имел рецептор.

Клетки иммунной системы. Главными клетками иммунной системы являются лимфоциты, число которых в организме человека превышает 10^{12} .

Существует два различных вида лимфоцитов, соответствующих двум основным видам иммунного ответа: Т-лимфоциты, развивающиеся в тимусе и отвечающие за клеточный иммунитет, и В-лимфоциты, развитие которых не зависит от тимуса и которые отвечают за гуморальный (опосредуемый антителами) иммунитет.

Лимфоциты развиваются из стволовых клеток, дающих также начало всем остальным клеткам крови. Стволовые клетки локализованы у взрослых животных в костном мозге, а их последующая



Пастер (Pasteur) Луи (1822—1895), французский микробиолог и химик, почетный член Петербургской АН (1893). Окончил Высшую нормальную школу в Париже (1847); с 1849 г. — профессор Страсбургского, Лилльского, затем Парижского университетов. С 1888 г. — первый директор созданного им Научно-исследовательского микробиологического института. Исследовал этиологию ряда инфекционных заболеваний и методы вакцинации. Выделил возбудителей сибирской язвы, краснухи, бешенства. Осуществил первую антирабическую прививку человеку (1885). Разработал способ обеззараживания пищевых продуктов нагреванием (пастеризация). Показал, что брожение и гниение — процессы, протекающие под влиянием ферментов микроорганизмов (1857).



Мечников Илья Ильич (1845—1916), русский биолог и патолог, почетный член Петербургской АН (1902). Окончил Харьковский университет (1864); работал в Новороссийском университете в Одессе и Петербургском университете, с 1888 г. — в Пастеровском институте в Париже. Провел основополагающие исследования в области микробиологии, иммунологии, эволюционной эмбриологии. Открыл явление фагоцитоза и разработал фагоцитарную теорию иммунитета. Автор классических работ по изучению брюшного тифа, туберкулеза, сифилиса. Лауреат Нобелевской премии по физиологии и медицине (1908, совместно с П. Эрлихом).



Бернет [Burnet] Фрэнк Макфарлейн (1899—1986), австралийский иммунолог и вирусолог. Окончил Мельбурнский университет (1923); с 1944 г. — директор Института медицинских исследований, а также профессор университета в Мельбурне. Основные работы — по изучению проблем иммунитета. Один из создателей клонально-селекционной теории иммунитета. Лауреат Нобелевской премии по физиологии и медицине (1960, совместно с П. Медваром).

дифференцировка приводит к образованию В- и Т-клеток. Место дифференцировки В-лимфоцитов у млекопитающих не установлено; у птиц таким органом является сумка Фабрициуса (*Bursa Fabricius*), откуда и произошло название всей популяции. Образование Т-клеток из стволовых клеток происходит в тимусе. Затем В- и Т-лимфоциты мигрируют по лимфатическим сосудам в периферические органы иммунной системы — лимфатические узлы, селезенку и т. п., где они проходят заключительные стадии дифференцировки.

Окончательная дифференцировка лимфоидных клеток осуществляется под действием антигенов. *Антиген* — это любая молекула или система молекул (например, клетка), способная индуцировать иммунный ответ. В частности, под воздействием антигена В-клетка превращается в плазматическую клетку, являющуюся фабрикой по производству антител: плазматическая клетка секретирует антитела со скоростью около 2000 молекул в секунду. Плазматическая клетка не способна к дальнейшей дифференцировке и пролиферации и погибает через несколько дней. Продуцируемые ею антитела способны специфически реагировать с отдельными участками структуры антигена, так называемыми антигенными детерминантами или эпитопами, которых, как правило, у антигена множество.

Существуют три основные функционально различные популяции Т-клеток, образующиеся в результате антиген-независимой дифференцировки предшественников Т-лимфоцитов: а) цитотоксические Т-клетки (*Т-киллеры*), осуществляющие разрушение чужеродных или инфицированных вирусом собственных клеток организма; б) помогающие или индуцирующие Т-клетки (*Т-хелперы*), которые «помогают» специфическим Т- и В-клеткам отвечать на антиген, а также активируют макрофаги; в) подавляющие Т-клетки (*Т-супрессоры*), которые ингибируют ответ специфических Т- и В-лимфоцитов.

Развитие иммунной реакции организма на введение чужеродного антигена включает целый ряд этапов и межклеточных взаимодействий. Первоначальный контакт с антигеном, запускающий иммунный процесс, осуществляют макрофаги; при этом антиген попадает внутрь макрофага и претерпевает процессинг — расщепление гидролитическими ферментами с вычленением сравнительно небольших фрагментов, несущих отдельные антигенные детерминанты. Заключительным этапом процессинга является экспрессия (обратный транспорт) фрагментов на поверхность макрофага, где они оказываются в комплексе с собственными антигенами гистосовместимости II класса (в случае мышей так называемыми Ia-белками, см. с. 220); только в таком, а не в нативном виде антиген может продолжать цепь иммунных реакций, а именно активировать Т-хелперы. В свою очередь, Т-хелперы осуществляют развитие заключительных стадий процесса, способствуя образованию эффекторных клеток — Т-киллеров и плазматических клеток — из соответствующих клеток-предшественников. На всех этапах, требующих межклеточных взаимодействий, важную роль играют растворимые медиаторы иммунного ответа — лимфокины (белки лимфоцитарного происхождения) и монокины (белки, синтезируемые макрофагами): эти гормоноподобные белки, вырабатываемые различными популяциями клеток — участников иммунного ответа, вызывают последовательный рост клона и дифференцировку активированных антигеном лимфоцитов. С их помощью достигается амплификация (усиление) иммунного ответа, они же участвуют в последующей супрессии (остановке) иммунной реакции; последний процесс опосредуется Т-лимфоцитами-супрессорами. Известны и цитотоксические лимфокины — лимфотоксин и фактор некроза опухолей, осуществляющие эффекторную функцию — лизис трансформированных клеток. Эффекторной системой, работающей на заключи-

тельном этапе иммунного ответа, является система комплемента, участвующая в деградации связанного с антителами антигена.

Таким образом, иммунная система представляет собой сложнейшую клеточную систему, в которой оперирует разветвленная сеть регуляторных механизмов, причем регуляция осуществляется как путем прямых межклеточных контактов, так и взаимодействий клетка — регуляторная молекула. Важную роль в развитии представлений об иммунорегуляции сыграли работы Н. Йерне.

Наличие у большинства антигенов множества эпитопов (антигенных детерминант) приводит к активации большого числа клонов В-лимфоцитов, имеющих рецепторы соответствующей специфичности. В результате образуются плазматические клетки секретируют сложный набор антител, реагирующих с разными участками поверхности антигена, т. е. наблюдается поликлональный ответ. Получить обычной иммунизацией антитела к заданной детерминанте очень сложно.

В настоящее время эту задачу удается решить с помощью так называемой гибридомной технологии, разработанной в середине 70-х годов Дж. Кёлером и Ц. Мильштейном. Гибридная технология основана на слиянии соматических клеток и заключается в гибридизации иммунных В-лимфоцитов с опухолевыми клетками (рис. 113).

Клетки лимфоузла (чаще всего селезенки), иммунизированного определенным антигеном животного, сливаются в присутствии полиэтиленгликоля с миеломными клетками. Такая гибридизация приводит к образованию клеток, унаследовавших от одной из родительских клеток (плазматической клетки) способность секретировать антитела, а от другой (миеломной) — способность к бесконечному делению. Ключевым моментом является отбор гибридных клеток, отделение от родительских клеток. Одна из популяций таких клеток — плазматиты — отмирает без каких-либо дополнительных воздействий в процессе культивирования клеток после слияния (как уже говорилось выше, плазматиты — короткоживущая клеточная популяция). Для того чтобы избавиться от родительских опухолевых клеток, используются мутантные миеломные клетки, дефицитные по двум ферментам — гипоксантин-фосфорибозилтрансферазе (ГФТ) и тимидинкиназе (ТК), — ответственным за запасной путь биосинтеза нуклеиновых кислот (использующий гипоксантин/гуанин и тимидин). Если блокировать и основной путь биосинтеза пуринов и пиримидинов с помощью аминоптерина, то такие мутанты оказываются нежизнеспособными и погибают. Гибридные же клетки, имеющие от второй родительской клетки гены ГФТ и ТК, способны к размножению в присутствии аминоптерина; таким образом, культивируя клетки после слияния на селективной среде (содержащей аминоптерин), удается добиться избирательного роста популяции гибридных клеток. Рассеивая гибридные клетки по лункам иммунологического планшета, добиваются того, чтобы в лунке оказался лишь один клеточный клон, отбираются клоны, секретирующие антитела нужной специфичности (для чего проверяется наличие соответствующих антител в культуральной среде), а затем наращиваются гибридные клетки в больших количествах *in vitro* или *in vivo* в виде *асцитов* у животных. Такая технология позволяет нарабатывать значительные количества так называемых моноклональных (продуктов одного клона) гомогенных антител. В большинстве случаев моноклональные антитела получают на мышах, реже на крысах. Получение человеческих моноклональных антител встречает серьезные методические затруднения, прежде всего из-за малодоступности иммунных лимфоцитов человека.

Структура и функция антител. Антитела — класс белков, продуцируемых В-лимфоцитами и осуществляющих первый этап в

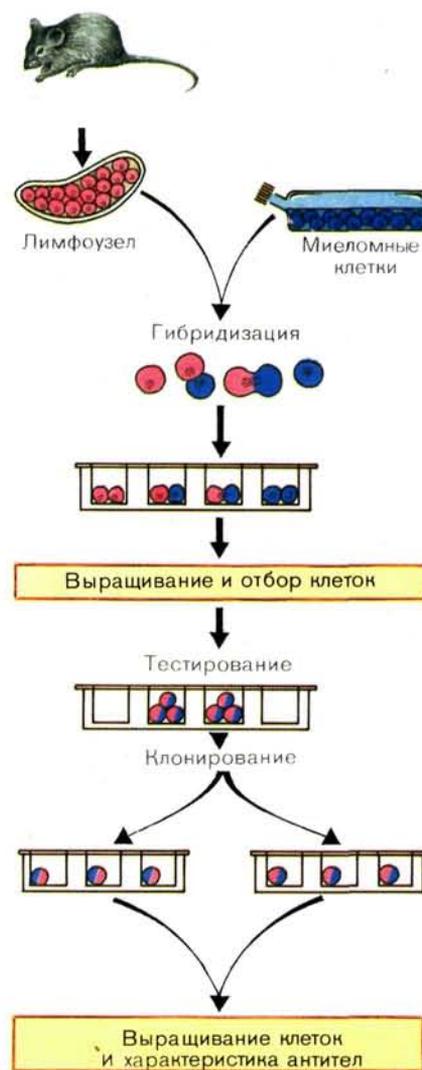
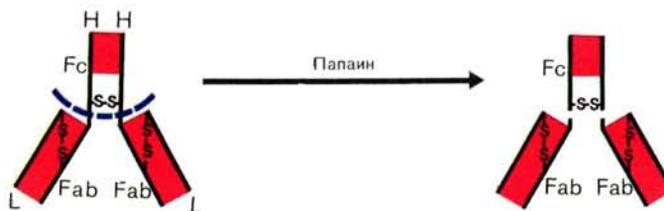


Рис. 113. Гибридная технология.

цепи превращений антигена — его связывание. Уникальным свойством антител является то, что они существуют в виде миллионов различных видов, каждый из которых имеет свой специфический участок связывания антигена. Обобщенно обозначаемые как иммуноглобулины (сокращенно Ig), антитела представляют один из основных классов белков крови, составляя около 20% от общего веса белков плазмы (общее число молекул антител в организме человека равно 10^{20}).

Молекула антитела состоит из четырех полипептидных цепей: двух легких (L) цепей и двух тяжелых (H) цепей. Четыре цепи удерживаются вместе с помощью нековалентных взаимодействий и S—S-связей. В результате ограниченного протеолиза папаином (Р. Портер, 1959) молекула иммуноглобулина расщепляется примерно в середине H-цепей на два идентичных Fab-фрагмента, каждый с одним антигенсвязывающим центром, и один Fc-фрагмент (рис. 114).

Рис. 114. Расщепление молекулы иммуноглобулина папаином.



Эрлих [Ehrlich] Пауль (1854—1915), немецкий бактериолог и химиотерапевт. Образование получил в университете Бреслау, а также Страсбургском, Фрейбургском и Лейпцигском университетах; с 1899 г. работал в Терапевтическом институте (близ Франкфурта-на-Майне). Основные работы посвящены проблемам иммунитета, разработке методов лечения инфекционных болезней, изучению химии лекарственных веществ. Основатель химиотерапии, впервые получил препараты салварсан (1907) и неосалварсан (1912). Описал различные формы лейкоцитов крови и показал значение костного мозга в кроветворении. Лауреат Нобелевской премии по физиологии и медицине (1908, совместно с И. И. Мечниковым).

Таким образом, молекула антитела имеет Y-образную форму с двумя идентичными антигенсвязывающими центрами — по одному на каждом крыле. Благодаря такой структуре антитела могут «сшивать» молекулы антигенов, имеющие две или несколько антигенных детерминант, в большие частицы — агрегаты (рис. 115), которые после достижения определенных размеров могут выпасть в осадок из раствора.

Успехи, достигнутые в изучении структуры иммуноглобулинов, оказались возможными благодаря установлению того факта, что каждый вид антител продуцируется отдельной популяцией клеток (клоном). Присутствующие в крови нормальных индивидов антитела являются продуктами секреции множества клонов и представляют собой сложнейшую смесь близких по структуре, но не идентичных белков. В связи с этим в качестве материала для исследования в настоящее время используются иммуноглобулины пациентов, страдающих множественной миеломой — заболеванием, при котором трансформированные клетки выделяют в кровь огромные количества иммуноглобулинов (так называемые миеломные белки). Эти «патологические» иммуноглобулины по структуре и биологическим свойствам являются «нормальными» иммуноглобулинами, однако секретируются одним клеточным клоном и поэтому гомогенны.

Исследование первичной структуры миеломных белков было проведено в конце 60-х годов в лабораториях Р. Портера в Оксфорде и Дж. Эдельмана в Нью-Йорке. Характерной чертой строения молекул иммуноглобулинов является так называемая доменная структура. И легкие и тяжелые цепи упакованы в компактные домены, состоящие примерно из 110 аминокислотных остатков и содержащие внутримолекулярные дисульфидные связи (рис. 116). Легкие (каждая содержит около 220 аминокислот) и тяжелые (каж-

дая содержит около 440 аминокислот) цепи антител имеют по две резко различающихся области: переменную (V), локализованную в N-концевой части полипептидной цепи, и следующую за ней константную (C). Цепи иммуноглобулинов данного класса различаются только по аминокислотным последовательностям V-областей и имеют практически идентичные C-области. Такая необычная для белков структура связана со свойствами этих систем. В самом деле, функции антител состоят, с одной стороны, во взаимодействии с антигенами, и в этом отношении они должны быть высокоспецифичными, а с другой стороны, самые разные по специфичности антитела должны обладать рядом общих свойств: связывать комплемент, фиксироваться на мембранах, взаимодействовать с некоторыми клетками и т. п. Поэтому переменность структуры V-областей обуславливает специфические свойства молекулы, тогда как структура константной области молекулы обеспечивает реализацию ряда общих качеств.

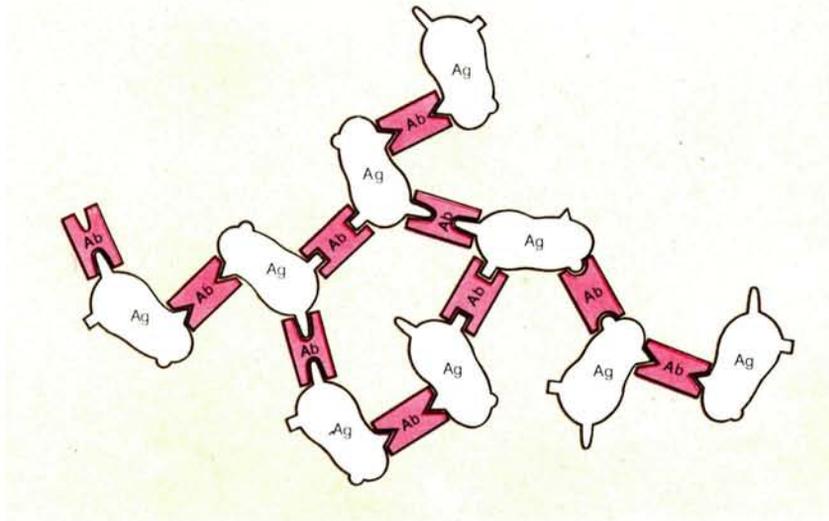


Рис. 115. Образование агрегатов при связывании антителами антигенов. Ag — антиген, Ab — антитело.

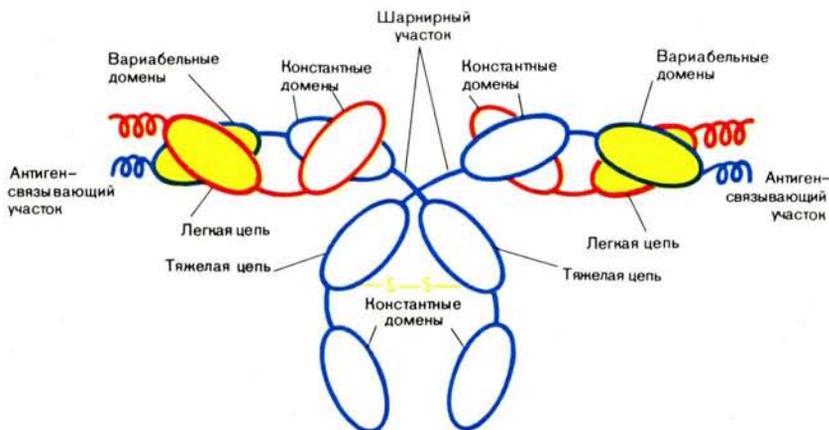


Рис. 116. Доменная структура молекулы иммуноглобулинов.



Йерне (Jerne) Нильс Кай (р. 1911), датский иммунолог. Образование получил в Копенгагенском университете (1951), основатель и руководитель Базельского института иммунологии (1969—1980). Идеи Йерне и его экспериментальные исследования сыграли важную роль в становлении современной молекулярной иммунологии, в частности в формировании представлений об иммунорегуляции. Лауреат Нобелевской премии по физиологии и медицине (1984).

Вариабельные участки (V_L) — (V_H) представляют собой единичные домены (рис. 117). Аминокислотные замены, обуславливающие структурные отличия, обычно группируются в нескольких так называемых гипервариабельных участках. В нативной молекуле иммуноглобулина V-области легкой и тяжелой цепи соединены так, что их гипервариабельные участки образуют единый активный центр. В настоящее время установлено, что антигенсвязывающий участок образован 20 — 30 аминокислотными остатками вариабельной части каждой цепи.

C-Область легкой цепи также представлена одним доменом (C_L), тогда как у тяжелых цепей она заметно длиннее и состоит из 3 — 4 линейно расположенных доменов (C_H1 — C_H3), структурно гомологичных C-области легкой цепи. Каждый домен упаковывается в отдельную относительно независимую глобулу, причем основной тип вторичной структуры глобулы — антипараллельная β -складчатая (рис. 118). Между глобулами находятся открытые участки полипептидной цепи, особенно чувствительные к действию протеолитических ферментов. Весьма вероятно, что именно эти участки цепи обеспечивают значительную гибкость всей структуры, позволяющей молекуле антитела приспособиться к конфигурации антигена или взаимодействовать с двумя антигенными детерминантами, расстояние между которыми может варьировать.

У позвоночных существует 5 различных классов антител: IgG (мол. масса 150 000), IgM (950 000), IgA (500 000), IgD (175 000) и IgE (200 000), каждый со своим собственным типом тяжелых цепей — α , β , ϵ , γ и μ соответственно.

Имуноглобулины IgG являются основным классом иммуноглобулинов крови. В отличие от них, IgM-белки представляют собой класс антител, продуцируемых В-клетками первыми в процессе развития иммунного ответа. Непосредственные предшественники В-клеток, так называемые пре-В-клетки, синтезируют только

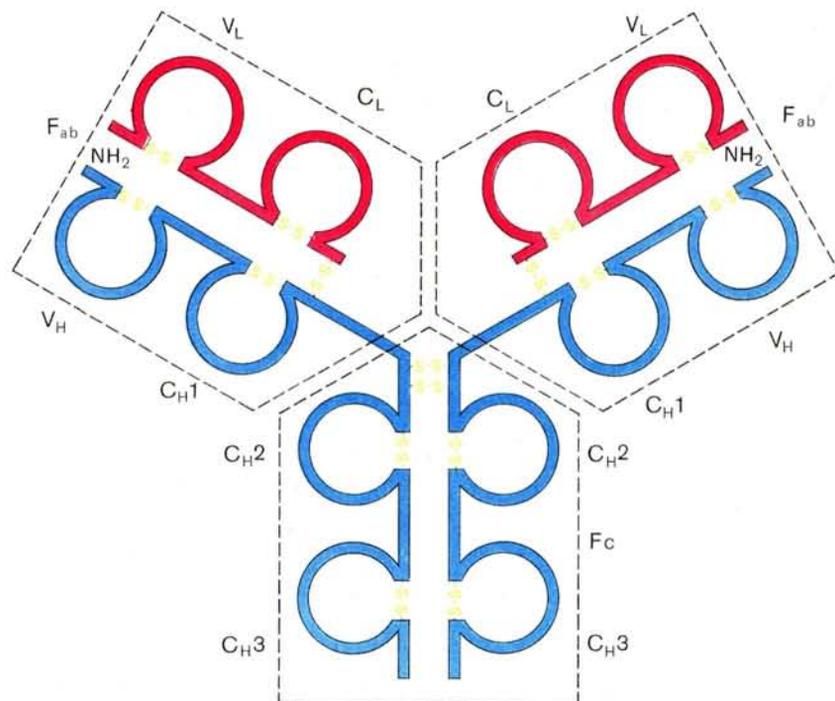
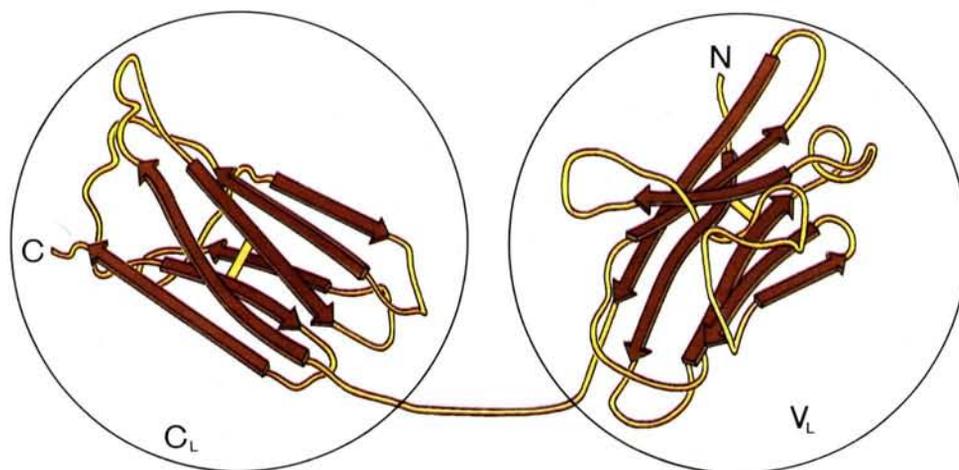


Рис. 117. Строение молекулы иммуноглобулина.

μ -цепи, которые накапливаются внутри клеток. Когда пре-В-клетки начинают синтезировать также и легкие цепи, они соединяются с μ -цепями и образуют молекулы IgM, которые встраиваются в плазматическую мембрану, где выступают в качестве антигенраспознающего рецептора. С этого времени клетки становятся зрелыми В-лимфоцитами и могут отвечать на антигенный стимул. Хотя все классы антител могут существовать в мембрано-связанном виде (в качестве антигенспецифических рецепторов клеточной поверхности) или в форме водорастворимых секретируемых молекул, IgM являются основным классом антител, обнаруженным на поверх-

Рис. 118. Вторичная структура легкой цепи иммуноглобулина.



ности большинства В-клеток. В секретируемой форме IgM-белки представляют собой пентамеры, построенные из 5 мономерных иммуноглобулинов, и имеют 10 антигенсвязывающих центров. Кроме того, каждый пентамер содержит одну копию полипептида, названного J-цепью (20 000), который синтезируется антителообразующей клеткой и ковалентно встраивается между двумя соседними Fc-областями.

Имуноглобулины IgA являются основным классом антител в секретах (молоке, слизи, слезах, секретах дыхательных путей и кишечника). Эти белки существуют либо в виде мономера (как IgG), либо чаще в виде димера, содержащего дополнительно одну J-цепь и еще одну полипептидную цепь, называемую секреторным компонентом (рис. 119). Секреторный компонент синтезируется эпителиальными клетками и первоначально находится на внешней поверхности этих клеток, где он служит в качестве рецептора для связывания IgA из крови. Образующийся комплекс (IgA — секреторный компонент) поглощается клетками путем эндоцитоза, переносится через цитоплазму эпителиальных клеток и выделяется в секреты. Дополнительно к этой транспортной роли секреторный компонент может также предохранять молекулу IgA от деградации протеолитическими ферментами в секретах.

Имуноглобулины IgD и IgE являются минорными компонентами сыворотки крови — их концентрация не превышает 0,3 мг/мл и 0,0001 мг/мл соответственно. Белки типа IgD выполняют функцию

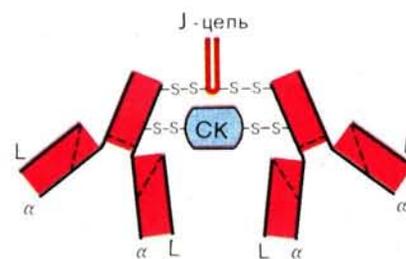


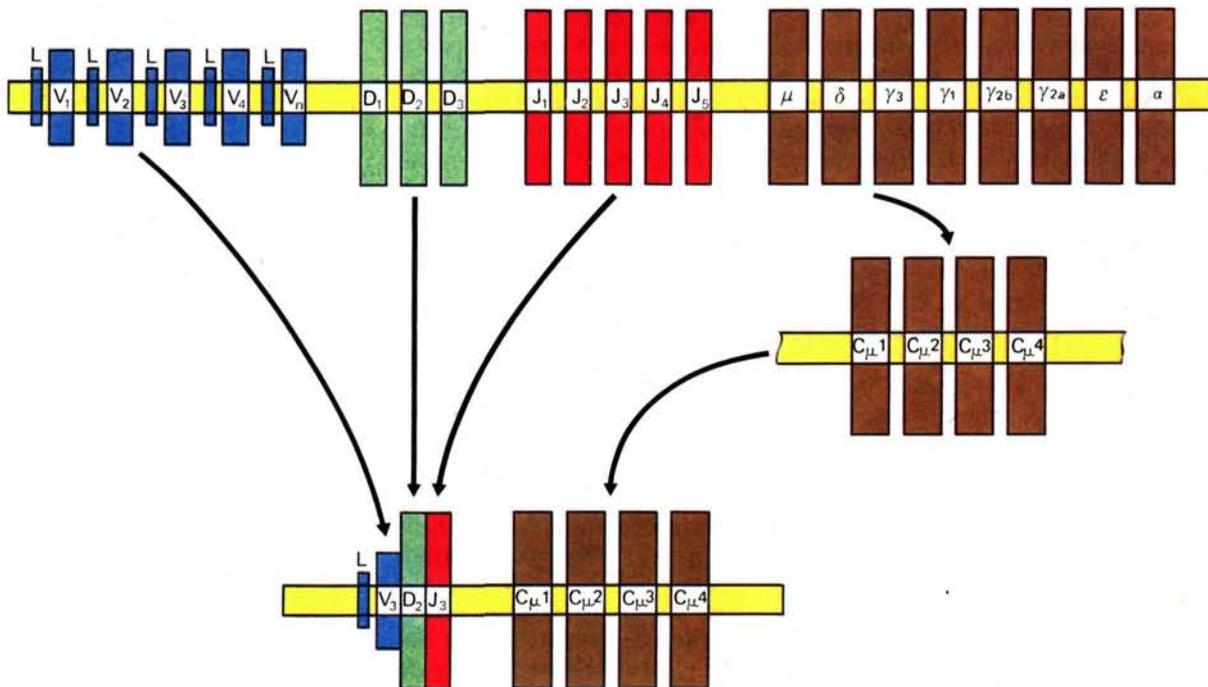
Рис. 119. Схема строения иммуноглобулина А:
СК — секреторный компонент;
L — легкая цепь;
 α — тяжелая цепь IgA.

рецепторов и имеют высокий процент связанных сахаров; их роль окончательно не выяснена. Иммуноглобулины IgE, осуществляющие в норме защиту от паразитарных инфекций, обуславливают многие аллергические реакции. Они связываются с высоким сродством (10^{10}M^{-1}) с поверхностью тучных клеток, и присоединение к ним антигена вызывает дегрануляцию и выброс в кровь биоактивных аминов, прежде всего гистамина и серотонина.

Наряду с пятью классами тяжелых цепей, высшие позвоночные имеют два типа L-цепей, а именно κ (каппа) и λ (лямбда), каждая из которых может быть ассоциирована с любой из H-цепей. Индивидуальная молекула антитела всегда состоит из идентичных L-цепей и идентичных H-цепей, благодаря чему ее антигенсвязывающие центры всегда одинаковы.

Сейчас считается установленным, что организм животного может синтезировать от 10^6 до 10^9 различных молекул антител. Этот набор, по-видимому, достаточен для того, чтобы для любой антигенной детерминанты нашелся соответствующий антигенсвязывающий центр. Поскольку антитела являются белками, а их структура кодируется генами, встает вопрос о том, каким образом такое громадное количество различных антител может кодироваться в геноме. В 1965 г. В. Дрейером и Ж. Беннетом была сформулирована гипотеза, впоследствии блестяще подтвердившаяся, что переменные и константные участки цепей иммуноглобулинов кодируются разными генами. Все гены переменных участков расположены кластером в одной области генома, а гены константных участков — в другой, далеко отстоящей от первой. Выяснилось также, что имеются еще две группы генов J и D (для тяжелых цепей), кодирующие небольшие участки (несколько аминокислот) полипептидной цепи иммуноглобулинов, лежащие между V- и C-областями. В таком виде гены находятся в зародышевой ДНК; в процессе дифференцировки

Рис. 120. Схема сборки структурного гена тяжелой цепи IgM.
L — лидерная последовательность.

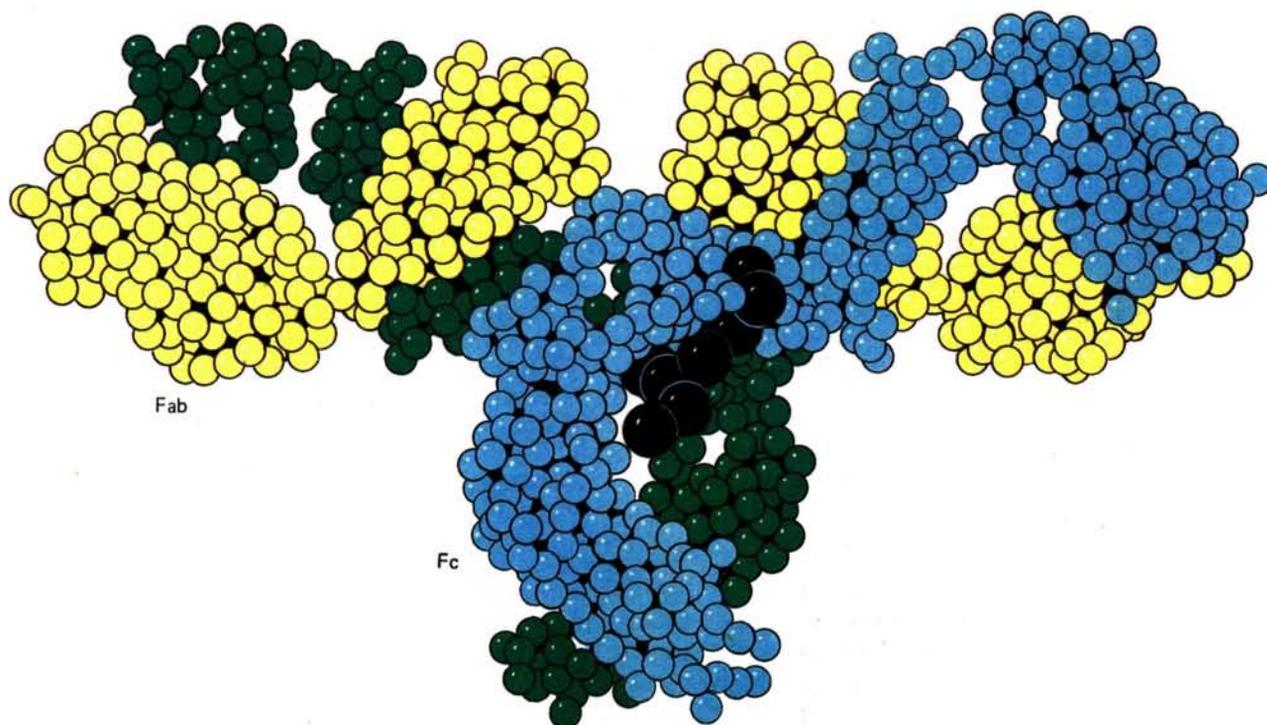


В-лимфоцитов начинается перегруппировка генома. Первоначально, в процессе превращения клетки-предшественника в пре-В-лимфоцит, происходит перемещение определенного V_H -гена к J_H - и D-гену с образованием генного сегмента V_H-D-J_H . Этот сегмент транскрибируется с находящимся теперь по соседству C_H -геном, в результате чего пре-В-лимфоциты синтезируют μ -цепи. В зрелом В-лимфоците может происходить еще одна транспозиция, и V_H-D-J_H присоединяется к какому-либо другому C_H -гену, приводя к экспрессии иммуноглобулина другого класса. В дальнейшем, в процессе транскрипции ДНК, а затем созревания мРНК из гена вырезаются лишние участки, после чего V-, D-, J-, и H-гены оказываются соединенными в непрерывную последовательность, которая и транслируется (рис. 120). Аналогичным образом собирается ген легкой цепи, который кодируется своими V_L - и C_L -генами.

В геноме имеется множество V-генов, некоторое количество J- и D-генов и по одному гену каждого субкласса тяжелых цепей. Как следствие такого не совсем обычного способа кодирования иммуноглобулиновых молекул возникает возможность появления громадного разнообразия антител с различающимся строением и свойствами. Действительно, в результате перестройки генома получают всевозможные комбинации указанных генов, что приводит к созданию молекул, каждая из которых обладает уникальной структурой. Строение (и значит, специфичность) активного центра варьируется в зависимости от строения образующих его V_L - и V_H -областей, а также сочетания их с разными J- и D-участками.

Изучение строения генов константных областей тяжелых цепей иммуноглобулинов показывает, что они состоят из ряда экзонов, каждый из которых кодирует отдельный домен молекулы. Принимая во внимание тот факт, что каждый из V-генов и C_L -генов кодирует один домен, а также структурную гомологию между домена-

Рис. 121. Пространственное строение иммуноглобулина G.





Кёлер (Köhler) Джон (р. 1946), немецкий биохимик. Образование получил во Фрайбурге (ФРГ) и Базеле (Швейцария), с 1985 г. — директор Института иммунологии Общества М. Планка во Фрайбурге. Занимается проблемами экспрессии генов иммуноглобулинов, выполнил основополагающие исследования по получению гибридом для производства моноклональных антител. Лауреат Нобелевской премии по физиологии и медицине (1984).



Доссе (Dausset) Жан Батист Габриэль Иохим (р. 1916), французский иммунолог. Окончил Парижский университет (1945), с 1968 г. — профессор этого же университета. Основные труды посвящены иммуногематологии. Впервые описал антиген лейкоцитов (1958) и антигенную систему лейкоцитов (1965). Выявил связь между антигенными свойствами лейкоцитов и тканевой совместимостью. Лауреат Нобелевской премии по физиологии и медицине (1980, совместно с Б. Бенасеррафом и Дж. Снеллом).

ми, можно предположить, что все они возникли в процессе эволюции путем серии дупликаций генов, начиная с предкового гена, кодирующего белок размером 110 аминокислот.

На основании рентгеноструктурного анализа выяснено пространственное строение как целой молекулы IgG, так и ее фрагментов (А. Эдмонсон, 1973). Установлено, что все домены иммуноглобулинов имеют очень похожую трехмерную структуру, получившую название *иммуноглобулиновой упаковки* (рис. 121). Каждый домен похож на «сэндвич», образованный двумя слоями белка: один слой содержит три витка полипептидной цепи, а другой — четыре. В каждом слое соседние витки являются антипараллельными и образуют β -структуру (рис. 118). Два слоя располагаются примерно параллельно друг другу и соединяются одной внутривиточной S—S-связью.

Структура переменных доменов такова, что гипервариабельные участки L- и H-цепей объединяются вместе и образуют антигенсвязывающий центр. Хотя изменение отдельных остатков в гипервариабельной части и приводит к образованию новых антигенсвязывающих центров, общая структура домена остается неизменной.

Антигены тканевой совместимости

Как уже отмечалось, в основе процессов отторжения пересаженных тканей лежат иммунные реакции. В настоящее время установлено, что причиной отторжения является генетическое несоответствие клеток донора и реципиента. Обнаружены специальные участки генома, контролирующие этот процесс. Общее число их достигает нескольких десятков, но только один из них, называемый главным комплексом гистосовместимости, определяет быстрое отторжение. Продукты главного комплекса гистосовместимости, вызывающие реакцию отторжения и участвующие в иммунологическом узнавании, экспрессированы на поверхности клеток и называются антигенами гистосовместимости. В 1980 г. работа трех ученых, внесших решающий вклад в развитие представлений об антигенных главных комплексах гистосовместимости, — Ж. Доссе (Франция), Дж. Д. Снелл (США) и Б. Бенасерраф (США), — была отмечена Нобелевской премией. Принято различать антигены гистосовместимости I, II и III классов. Наиболее изучены антигены гистосовместимости I класса — основные трансплантационные антигены, по которым Т-киллеры изучают чужеродные клетки. Антигены гистосовместимости I класса есть на всех ядерных клетках организма. Они состоят из двух нековалентно связанных субъединиц: интегрального мембранного гликопротеина с молекулярной массой 45 000 (тяжелой субъединицы), имеющего три надмембранных домена (α_1 — α_3), и β_2 -микроглобулина β_2M — неполиморфного полипептида с молекулярной массой 12 000 (рис. 122). Только тяжелая субъединица кодируется главным комплексом гистосовместимости, в то время как ген β_2 -микроглобулина находится на другой хромосоме (второй у мыши и пятнадцатой у человека). Тяжелая цепь содержит ковалентно связанные олигосахариды и определяет антигенную специфичность молекулы.

Короткий C-концевой район тяжелой цепи ответствен за фиксацию молекулы в мембране и содержит два участка с молекулярной массой примерно по 5000 каждый, сильно различающихся по полярности аминокислот, входящих в их состав. Первый, содержащий

С-концевую аминокислоту, состоит главным образом из полярных аминокислот и экспонирован в цитоплазму клетки. Второй, содержащий большое количество неполярных аминокислот (лейцин, изолейцин, валин), пронизывает гидрофобную область мембраны.

Надмембранная часть молекулы может быть легко переведена в раствор путем ограниченного протеолиза с помощью папаина. Папаиновый фрагмент наиболее детально изучен химически.

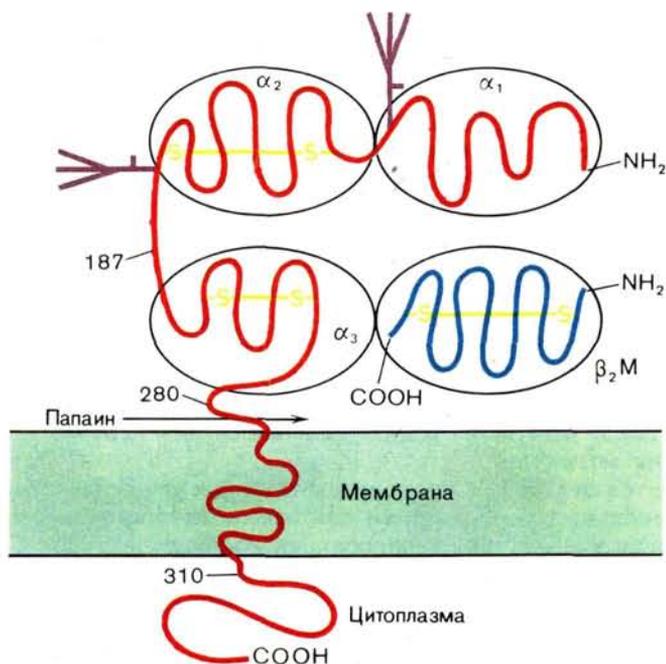


Рис. 122. Структура H—2K,D-антигена.

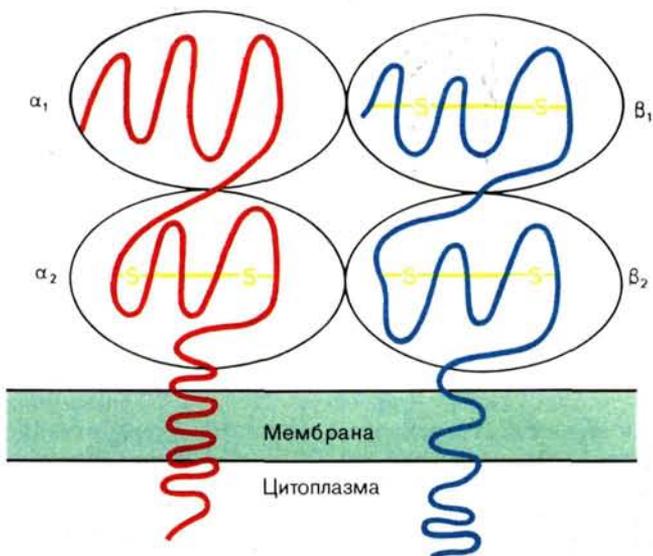


Рис. 123. Структура Ia-антигена.



Эдельман [Edelman] Джералд Морис (р. 1929), американский биохимик. Окончил Пенсильванский университет (1954), в настоящее время — в Рокфеллеровском университете. Основные работы посвящены изучению строения молекул антител. Показал (1959), что молекулы антител состоят из двух типов пептидных цепей (тяжелых и легких). Расшифровал строение молекулы одного из иммуноглобулинов и выдвинул гипотезу о третичной структуре активного центра антител (1962, совместно с Р. Портером). Лауреат Нобелевской премии по физиологии и медицине (1972, совместно с Р. Портером).

Строение антигенов гистосовместимости I класса было выяснено в 70-х годах работами ученых разных стран, прежде всего лабораторий Дж. Стрёминджера и С. Натансона (США). Для такого рода белков (H — 2K, D, L-антигенов мыши и HLA — A, B, C-антигенов человека) характерна очень высокая степень структурной гомологии (70%); вместе с тем имеются два гипервариабельных участка, локализованных в N-концевом домене. Доказан статистически достоверный уровень гомологии между надмембранными доменами антигенов тканевой совместимости, C_H-доменами иммуноглобулинов и β_2 -микроглобулином; эта гомология может указывать на общее эволюционное происхождение этих белков.

Другим продуктом главного комплекса гистосовместимости являются Ia-белки (антигены II класса), участвующие в регуляции иммунного ответа, т. е. его подавлении или активации. Ia-Белки экспрессируются клетками иммунной системы (лимфоцитами и макрофагами) и неоднородны по своей структуре (в частности Ia-белки различны у Т-хелперов и Т-супрессоров). Молекула Ia-белка состоит из двух полипептидных цепей α и β с молекулярной массой 34 000 и 28 000 соответственно (рис. 123). Обе цепи представляют собой погруженные в мембрану гликопротеины, также имеющие доменную структуру ($\alpha_1, \alpha_2, \beta_1, \beta_2$), причем α - и β -субъединицы не имеют структурной гомологии. Кроме того, Ia-белки различных видов животных существенно различаются между собой.

Синтезированные de novo α - и β -цепи антигенов II класса, так же как и тяжелые цепи антигенов I класса, содержат N-концевой гидрофобный сигнальный пептид. Этот пептид инициирует встраивание синтезирующихся молекул в мембраны эндоплазматического ретикулаума, после чего происходит удаление самого пептида и гликозилирование молекулы.

В настоящее время проводится широкое изучение структурно-функциональных особенностей как самих антигенов тканевой совместимости, так и генов и распознающих их рецепторов Т-лимфоцитов.

Система комплемента

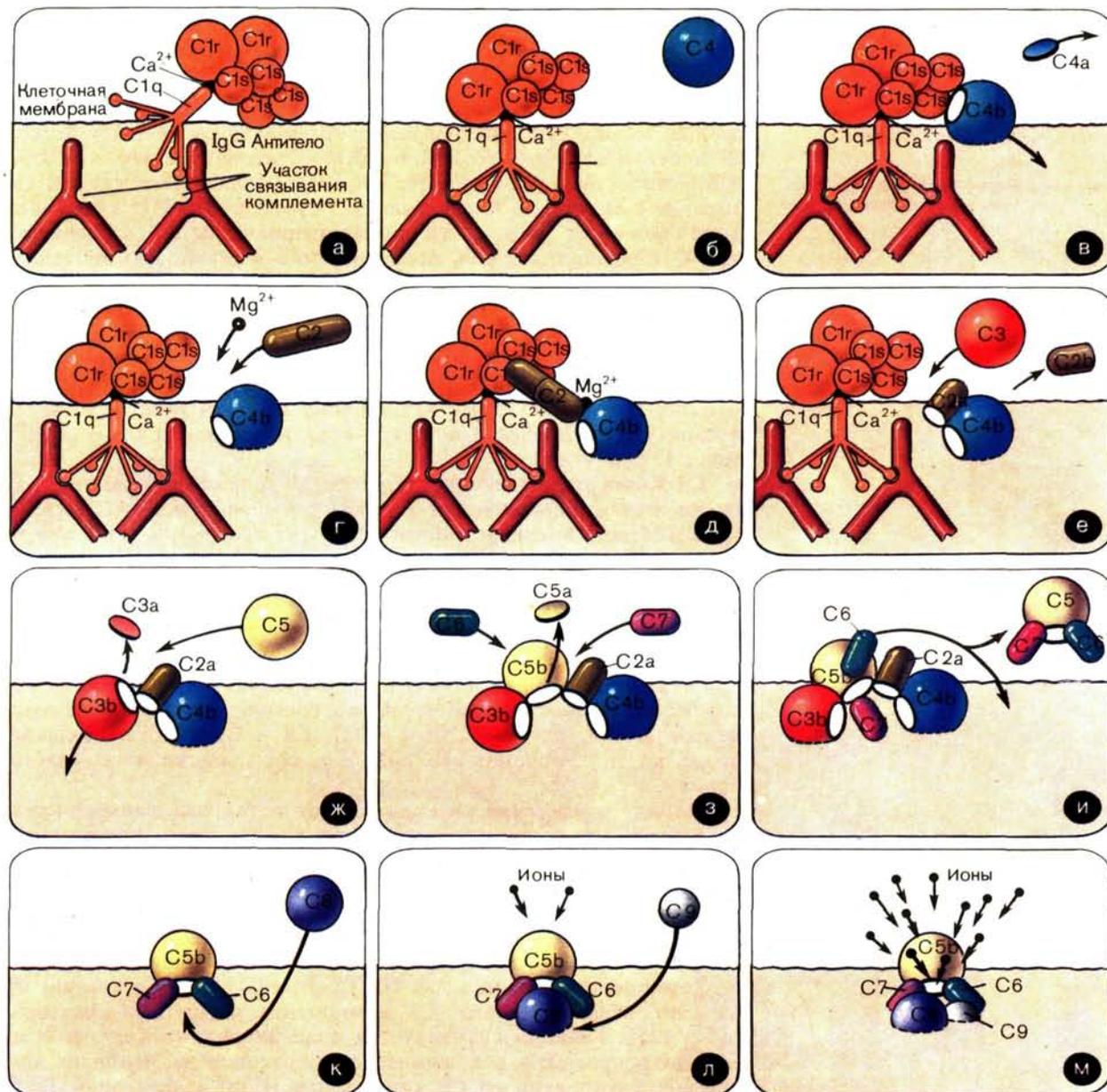
Одним из главных компонентов иммунной системы организма является комплемент. Комплемент был открыт французским ученым Ж. Борде в конце прошлого столетия как результат обнаружения способности нормальной сыворотки крови убивать бактериальные клетки в присутствии соответствующих антител и назван «алексином». Современное название комплементу дал П. Эрлих.

Комплемент представляет собой сложный комплекс белков, состоящий из 20 взаимодействующих компонентов, обозначаемых C1, C2, C3 и т. д. до C9, фактор В, фактор D и ряд регуляторных белков. Все они являются водорастворимыми белками с молекулярными массами от 24 000 до 400 000 (табл. 9), циркулирующими в крови и внеклеточной жидкости. Большинство этих белков являются неактивными вплоть до «запуска» системы в момент образования комплекса антиген — антитело. После активации комплемента его действие носит каскадный характер и представляет собой серию протеолитических реакций. Образно говоря, отношения между антителами и комплементом напоминают собой отношения между ключом зажигания и мотором: взаимодействие антител с антигеном включает мотор.

На рисунке 124 схематически изображена последовательность событий, происходящих на мембране при активации комплемента.

Начальным этапом в цепи процессов активации комплемента является связывание его первого компонента C1 с комплементфиксирующими участками антител (IgG и IgM), образовавшими комплексы антиген — антитело на поверхности клетки (рис. 124, а, б). В состав C1 входят три субъединицы C1q, C1r и C1s, выполняющие различные функции. Связывание компонента C1 происходит посредством белка C1q, который часто называют фактором узнавания. Эта цепь событий характеризует основной, или *классический*, путь активации комплемента. Далее в превращениях участвуют так называемые ранние компоненты комплемента (C4, C2, C3), которые

Рис. 124. Классический путь активации системы комплемента.



Общая характеристика компонентов комплемента человека

Компонент	Молекулярная масса	Число цепей	Константа седиментации
C1	900 000		18 s
C1q	400 000	6×3	11 s
C1r	168 000	2	7 s
C1s	79 000	1	4 s
C4	230 000	3	10 s
C2	117 000	—	6 s
C3	185 000	2	10 s
C5	170 000	2	9 s
C6	125 000	1	6 s
C7	130 000	1	6 s
C8	150 000	3	8 s
C9	79 000	—	4 s

последовательно активируются путем протеолитического расщепления. Поскольку активированный компонент расщепляет несколько молекул следующего компонента, активация ранних компонентов комплемента представляет собой усиливающийся каскад. Связывание с антителом C1q активирует субъединицу C1r в результате отщепления от нее части полипептидной цепи. Активированный C1r расщепляет C1s, превращая его в сериновую протеиназу. Таким образом, срабатывает пусковой механизм системы комплемента. Дальнейшие процессы активации, приводящие к лизису клеток, происходят уже без участия иммуноглобулинов или их комплексов с антигеном. Активированный C1s последовательно расщепляет четвертый и второй компоненты комплемента C4 и C2, которые прикрепляются к находящемуся рядом участку мембраны и образуют активный комплекс — так называемую *C3-конвертазу* (рис. 124, в — е).

C3-Конвертаза активирует третий компонент комплемента (C3) также путем расщепления его на два фрагмента — C3a и C3b (рис. 124, ж). Активированный C3 (C3b) ассоциируется с мембраносвязанной C3-конвертазой, образуя новый ферментный комплекс — *C5-конвертазу*. Последняя активирует пятый компонент комплемента, находящийся в растворе, также путем отщепления полипептидного фрагмента от неактивного C5 (рис. 124, з).

Далее активированный пятый компонент комплемента (C5b) прикрепляется к мембране, и на нем собирается большой мембраноатакующий, литический комплекс, состоящий из поздних компонентов комплемента — C5b, C6, C7, C8 и C9 и осуществляющий лизис клеток мишени; все превращения происходят с участием ионов Ca^{2+} и Mg^{2+} (рис. 124, и — м).

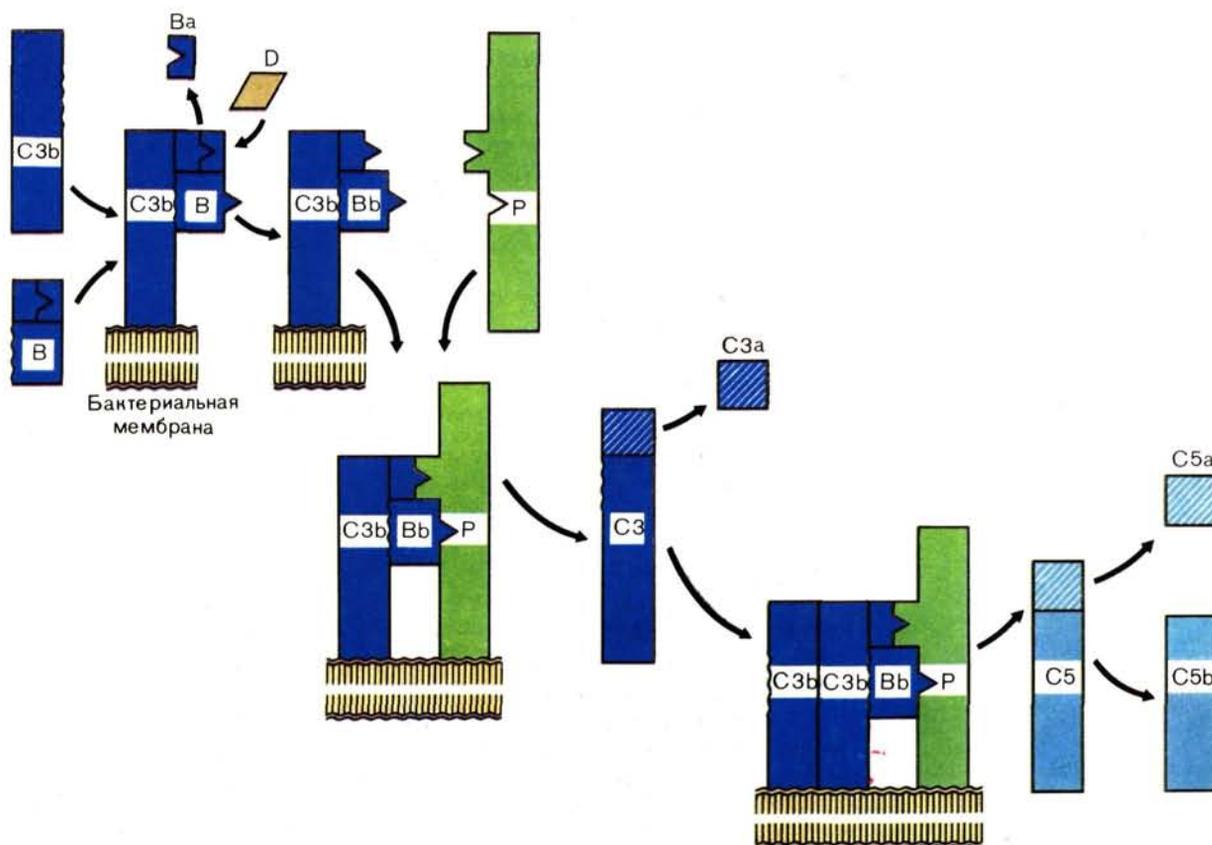
Наряду с классическим существует и так называемый альтернативный путь, или путь активации комплемента, происходящей без участия антител, обнаруженный Л. Пилемером. Этот путь является, по-видимому, основным на ранних этапах борьбы организма с бактериальной инфекцией, когда антитела еще не образовались, представляя собой первую линию защиты. Альтернативный путь также заканчивается образованием C5-конвертазы, однако ее формирование происходит без участия C1, C2 и C4 компонентов за счет взаимодействия C3 компонента с другими факторами (рис. 125). Реакция активируется полисахаридами клеточных стенок микроорганизмов и начинается с создания на мембране комплекса активированного C3 компонента (C3b) с фактором В. По-

следний расщепляется фактором D, что приводит к образованию альтернативной C3-конвертазы C3bBb, которая стабилизируется присоединением пропердина P. Добавление к этому комплексу дополнительных C3b компонентов дает C5-конвертазу альтернативного пути C3b_nBbP. Как и в классическом пути, образовавшаяся C5-конвертаза активирует пятый компонент комплемента, ответственный за сборку мембрано-атакующего комплекса.

Механизм цитолитического действия комплемента окончательно еще не установлен. Однако известно, что образующийся комплекс внедряется в гидрофобную зону мембраны и его компоненты формируют в ней воронку диаметром около 10 нм. Это приводит к нарушению целостности мембраны: выходу из клетки ионов, низкомолекулярных компонентов цитоплазмы, белков, поступлению в клетку воды и т. п., что в конечном счете приводит к ее гибели и разрушению. Процесс настолько эффективен, что достаточно одного комплекса для разрушения клетки.

Необходимым условием для предотвращения разрушительного действия комплемента на собственный организм является наличие эффективных механизмов обратной регуляции. Существует два основных механизма такой регуляции. Первый — за счет действия ряда ингибиторных белков, которые связываются с активированными компонентами комплемента и блокируют их дальнейшее действие. Такие ингибиторы имеются, например, для C1 и C3b. Второй механизм основан на нестабильности некоторых компонентов каскада, в частности C4.

Рис. 125. Альтернативный путь активации системы комплемента.



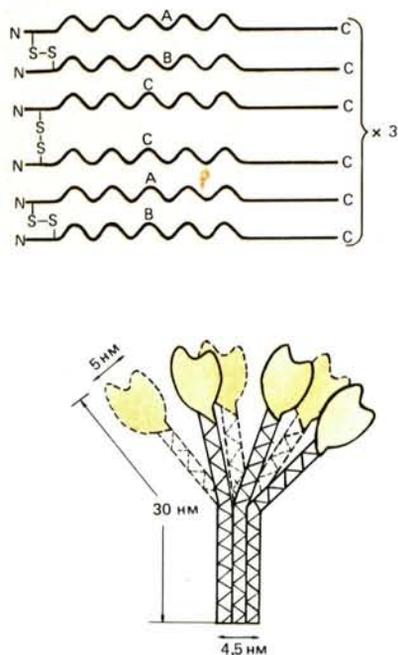


Рис. 126. Схематическое строение молекулы C1q компонента комплемента.

В настоящее время практически все белки системы комплемента выделены в чистом виде и охарактеризованы, установлена полная первичная структура многих из них. Впервые работы по изучению структуры компонентов комплемента были проведены лабораториями Р. Портера (Великобритания) и Г. Фэя (США). В структурном отношении детально изучен фактор C1, функционирующая молекула которого содержит одну C1q, две C1r и две C1s субъединицы, связанные нековалентно. Белок C1q во многих отношениях уникален. Его молекула состоит из трех типов близких по природе полипептидных цепей (A, B и C) с молекулярной массой 23 500 каждая. В структуре каждой цепи можно выделить короткий N-концевой фрагмент, C-концевой глобулярный участок и достаточно протяженный коллагеноподобный район. Молекула C1q содержит в своем составе большое число остатков гидроксизина и гидроксипролина, а также углеводы (глюкозу и галактозу).

A- и B-цепи связаны между собой дисульфидной связью, локализованной в N-концевых фрагментах, и нековалентно взаимодействуют с C-цепью. При этом их вытянутые части образуют единую трехспиральную структуру, подобную той, которая характерна для коллагена, тогда как C-концевые неколлагеновые фрагменты образуют единую глобулярную часть. Образованные таким способом структурные единицы могут легко димеризоваться за счет возникновения дисульфидной связи между N-концевыми фрагментами C-цепей. Нативная молекула C1q, имеющая молекулярную массу около 400 000, состоит из трех таких димеров, связанных нековалентными взаимодействиями между коллагеновыми частями цепей. Внешне такая молекула напоминает букет тюльпанов (рис. 126).

Необычная структура C1q-компонента комплемента объясняется характером выполняемых им функций. Глобулярные области ответственны за связывание с Fc-фрагментами иммуноглобулинов, причем для активации каскада необходимо, чтобы произошло связывание с участием как минимум двух «головок». Структурное разнообразие и полифункциональность характерны и для других компонентов комплемента.

Естественно, что активация комплемента может представлять известную угрозу и для организма хозяина. Однако в норме анти-тело фиксирует комплемент только на чужеродных клетках.

Медиаторы иммунного ответа

Интерфероны. В середине 30-х годов было установлено, что заражение животного каким-либо вирусом защищает его от последующего заражения другим вирусом; это явление получило название вирусной интерференции. Однако потребовалась почти четверть века, прежде чем был выделен в индивидуальном состоянии агент, ответственный за это явление. В 1957 г. английские ученые А. Айзекс и Д. Линденман впервые обнаружили белок, продуцируемый зараженными вирусом клетками, и назвали этот белок *интерфероном*.

Интерфероны — противовирусные агенты универсального действия. Они активны против любых вирусов, но, как правило, обладают видовой специфичностью — каждому виду животных свойствен свой интерферон. Как сейчас установлено, интерфероны — это семейство белков, каждый со специфическим спектром дейст-

вия. Существуют лейкоцитарные, или α -интерфероны, фибробластные, или β -интерфероны, и, наконец, иммунные, или γ -интерфероны.

Структура интерферонов была установлена в конце 70-х — начале 80-х годов. Из природных источников эти белки выделяются в весьма небольших количествах, что затрудняло определение их аминокислотных последовательностей традиционными методами белковой химии. Оказалось, что интерфероны представляют собой небольшие белки с молекулярной массой около 17 500. Существенного прогресса удалось добиться на основе анализа соответствующих генов и сравнения полученных результатов с данными по частичной структуре белков. Определение структуры гена белка, для которого не было данных об аминокислотной последовательности, потребовало разработки специального подхода. Эта задача была успешно решена японским ученым Т. Танигучи на примере β -интерферона. Позднее в лаборатории Ч. Вайсмана (Швейцария) была выяснена структура гена α -интерферона, а структура самого белка впервые определена Дж. Шайвели (США). На рисунке 127 приведена последовательность гена α -интерферона человека и выведенная из нее структура белка, содержащего 166 аминокислотных остатков.

Следует отметить, что у каждого вида животных имеется несколько α -интерферонов (в частности, у человека найдено 14 различных генов α -интерферонов), один или несколько β -интерферонов и всегда один γ -интерферон. Большинство интерферонов α -типа имеют негликозилированные пептидные цепи, тогда как β - и γ -интерфероны являются гликопротеинами. Как следует из нуклеотид-

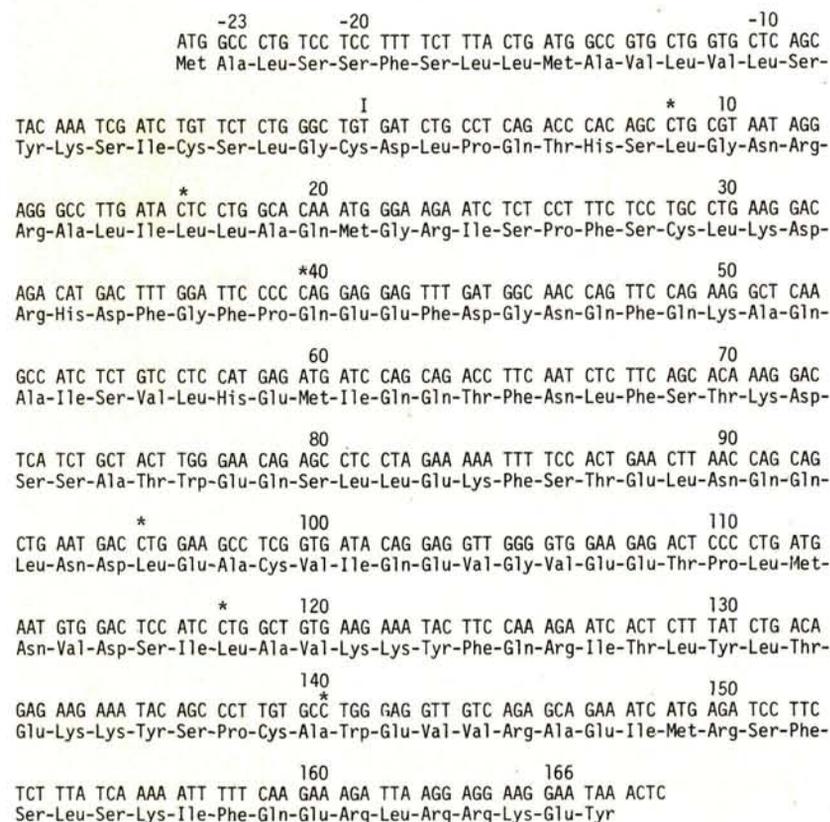


Рис. 127. Аминокислотная последовательность α -интерферона человека и нуклеотидная последовательность соответствующего гена.

ной последовательности, на начальном этапе синтезируется предшественник интерферона, содержащий сигнальный пептид из 23 аминокислотных остатков; последний отщепляется в результате процессинга при секреции белка. β - и γ -Интерфероны также синтезируются в виде предшественников (у человека β -интерферон содержит 166 аминокислотных остатков, а γ -интерферон — 143 остатка).

α - и β -Интерфероны представляют собой типичные глобулярные белки (содержание α -спиральных структур составляет 40—75%). В α -интерферонах обнаружены две дисульфидные связи.

Механизм биологического действия интерферона в общих чертах выяснен. Интерфероны синтезируются и секретируются одними клетками и проявляют свой эффект, воздействуя на другие клетки, в этом отношении они подобны гормонам. Общая схема биологического действия интерферона представлена на рисунке 128.

Связываясь с клеточными рецепторами, интерфероны индуцируют синтез двух ферментов — 2',5'-олигоаденилатсинтетазы и протеинкиназы, вероятно, за счет инициации транскрипции соответствующих генов. Оба образующихся фермента проявляют свою активность в присутствии двухцепочечных РНК, а именно такие РНК являются продуктами репликации многих вирусов или содержатся в их вирионах. Первый фермент синтезирует 2',5'-олигоаденилаты (из АТФ), которые активируют клеточную рибонуклеазу I; второй фермент фосфорилирует фактор инициации трансляции IF2. Конечным результатом этих процессов является ингибирование биосинтеза белка и размножения вируса в инфицированной клетке, а затем ее лизис. Доказано, что существуют и альтернативные механизмы действия интерферонов (инактивация тРНК, вмешательство в процессы метилирования и т. п.).

Интерфероны — мощные противовирусные агенты. Они во все возрастающем масштабе используются в медицинской практике для лечения вирусных заболеваний, таких, как гепатит, энцефалит, бешенство, герпес и т. п. Имеются достаточно обоснованные данные об эффективности ряда интерферонов против некоторых форм рака. Интерфероны действуют в весьма небольших дозах при местном или внутримышечном применении; при этом в ряде случаев у пациентов отмечается некоторое повышение температуры. В мировой практике в настоящее время накапливается все больший опыт использования интерферонов при самых различных заболеваниях, в том числе при эпидемиях гриппа, аденовирусных инфекциях и т. п. Примечательно, что описаны случаи эффективного использования интерферонов для борьбы с вирусами не только сельскохозяйственных животных, но и многих культурных растений.

Широкому применению интерферонов в медицинской практике долгое время препятствовало отсутствие экономичных методов их получения. Первоначально наибольшее распространение получил метод производства лейкоцитарного интерферона на основе донорской крови (К. Кантелл, Финляндия, 1977). При этом лейкоциты подвергаются инкубации с каким-либо вирусом (например, вирус Сендай или вирус болезни Ньюкасла), в качестве компонента культуральной среды используется сыворотка крови человека или быка (иногда казеин молока). Последующая очистка с помощью хроматографических приемов дает достаточно концентрированный препарат интерферона.

Радикальным решением вопроса оказалось использование методов генетической инженерии. В частности, гены интерферона удалось экспрессировать в различных клетках, в том числе бактериальных, дрожжевых и клетках млекопитающих (см. с. 378).

Лимфокины и монокины. В процессе развития защитной реакции организма активированные лимфоциты секретируют набор бел-

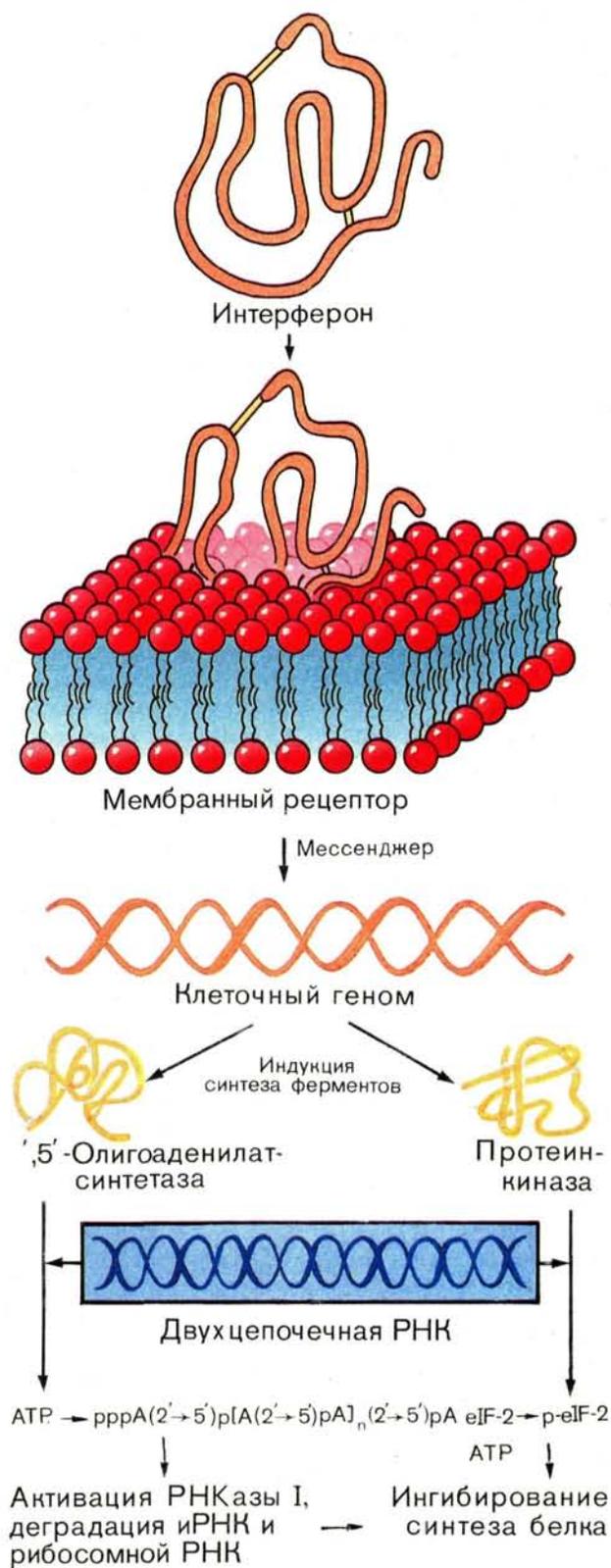


Рис. 128. Механизм действия интерферона.

и затем подтверждена анализом самого белка. К одному из аминокислотных остатков (Thr-3) интерлейкина 2 присоединена углеводная цепь (за счет O-гликозидной связи), в состав которой входят остатки N-ацетилнейраминовой (сиаловой) кислоты (NeuNAc), галактозы (Gal) и N-ацетилгалактозамина (GalNAc). Характерно, что наличие углеводов не влияет на биологическое действие интерлейкина 2: рекомбинантный IL 2 имеет ту же удельную активность, что и природный.

Попытки выделить небольшой пептид, моделирующий активный центр молекулы, не увенчались успехом. Использование метода направленного точечного мутагенеза и моноклональных антител к определенным участкам молекулы IL 2 показало, что активный центр формируется аминокислотными остатками, находящимися на N- и C-концах молекулы, сближенных в пространственной структуре молекулы за счет дисульфидной связи.

По характеру биологического действия интерлейкин 2 напоминает гормоны: он продуцируется клетками в весьма малых количествах, активен в концентрациях порядка нескольких пикомолей (на 1 мл), действует на клетку-мишень через соответствующий рецептор на ее поверхности ($K_d = 3 - 5 \times 10^{-12} \text{M}$). «Период полужизни» интерлейкина 2 в кровотоке измеряется минутами.

Интерлейкин 2, получаемый в настоящее время в промышленном масштабе на основе методов генетической инженерии (СССР, США), используется при лечении вирусных заболеваний, иммунодефицитов, некоторых форм рака.

Интерлейкин 1 (IL 1, или лимфоцитактивирующий фактор), впервые описанный И. Джери и Б. Ваксманом (США), продуцируется активированными макрофагами, а также полиморфноядерными лейкоцитами, эпителиальными клетками кожи и другими клетками. Он инициирует пролиферацию фибробластов, синтез простагландинов; основной же мишенью являются активированные Т-хелперы, которые в присутствии IL 1 секретируют IL 2.

Интерлейкины 1 человека представляют собой белки, состоящие из 159 (IL 1 α) и 153 (IL 1 β) аминокислотных остатков. В ходе биосинтеза они получают из высокомолекулярных белков-предшественников (271 и 269 аминокислотных остатков соответственно).

В отличие от интерлейкинов 2 и 1, открытый Д. Иле с соавторами (США) интерлейкин 3 (из мыши, IL 3) действует не на зрелые клетки иммунной системы, а на клетки-предшественники: он вызывает рост колоний стволовых клеток и предшественников β -клеток. Источником интерлейкина 3 являются активированные Т-хелперы. По характеру своей активности IL 3 принадлежит к факторам, стимулирующим рост колоний различных клеток (CSF); он действует в концентрациях $10^{-11} - 10^{-12} \text{M}$. Интерлейкин 3 является гликопротеином, в состав которого входят 134 аминокислотных остатка.

К группе белков, продуцируемых активированными клетками иммунной системы и родственными интерлейкинам, следует отнести *лимфотоксин* и *фактор некроза опухолей*.

Лимфотоксин (LT) был впервые описан в конце 60-х годов как продукт активированных лимфоцитов, обладающий цитостатической активностью. Действие лимфотоксина на опухолевые клетки заметно усиливается в присутствии γ -интерферона. Лимфотоксин человека является гликопротеином (171 аминокислотный остаток); углеводная цепь связана N-гликозидной связью с Asn-62 (рис. 130).

Фактор некроза опухолей (TNF). TNF вызывает лизис некоторых типов опухолевых клеток. Он вырабатывается активированными макрофагами. Строение TNF человека, проявляющего заметную гомологию с лимфотоксинами, установлено на основе ана-

посторонних веществ, например экстрактов некоторых тканей. На этом основании принято различать *внутренний* (собственный) и *внешний пути* свертывания крови. При обычном свертывании крови внутренний и внешний пути действуют взаимосвязанно.

Э. Дэви установил первичную структуру ряда факторов свертывания крови и внес значительный вклад в расшифровку молекулярных механизмов процесса свертывания крови.

С биохимической точки зрения свертывание крови и образование сгустка представляют собой каскад ферментативных реакций, осуществляемых группой специальных белков (белковых факторов). В цепи последовательных превращений каждый образовавшийся фактор вызывает активацию следующего по принципу профермент → фермент, так что небольшие количества того или иного фактора на начальных этапах процесса вызывают лавинообразное усиление на последующих стадиях и, как результат, быструю ответную реакцию на травму. Внутренний и внешний пути свертывания различаются лишь начальными стадиями, а затем они сливаются в единый, *общий путь свертывания* (рис. 131) (Р. Макферлан, 1965—1966). Внутренний путь свертывания крови реализуется при адсорбции фермента калликреина и высокомолекулярного кининогена на поврежденной поверхности эндотелия сосудов или на какой-либо инородной поверхности (стекло, керамика и др.). При запуске *внутреннего пути* фактор XII (известный также под названием фактора Хагемана) расщепляется калликреином. Это расщепление осуществляется двумя путями — с образованием фак-

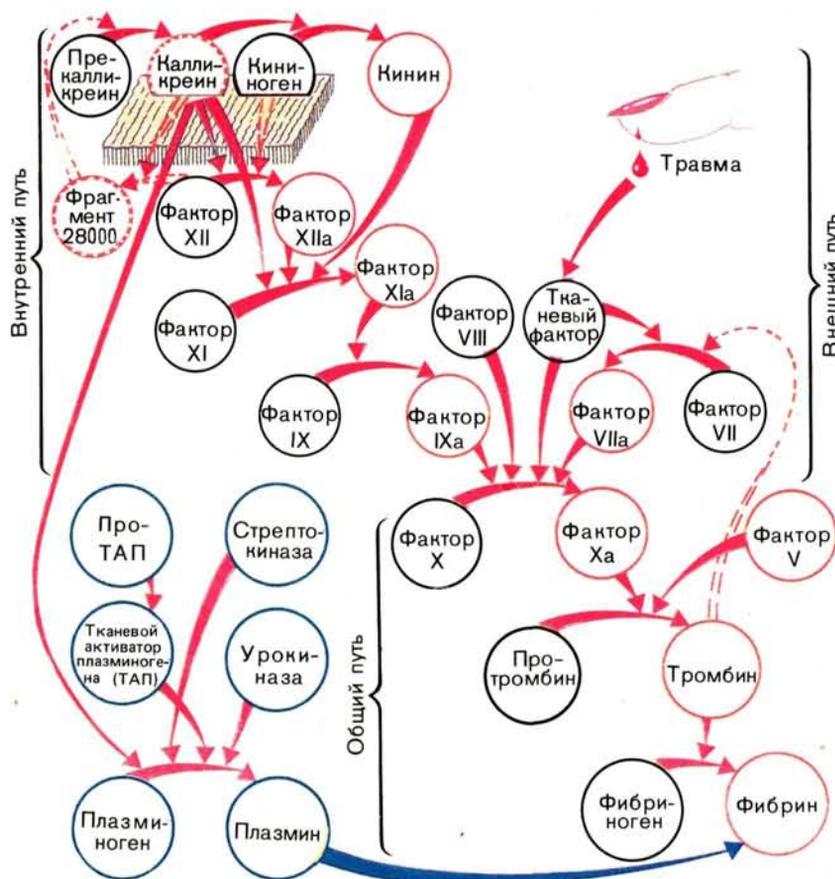


Рис. 131. Белки каскада свертывания крови и фибринолиза.



Дэви (Davie) Эрл В. (р. 1927), американский биохимик. Образование получил в Вашингтонском университете (1954), в настоящее время работает в университете Вашингтона в Сиэтле. Основные работы в области химии белка, энзимологии и рекомбинантных ДНК. Изучал молекулярные механизмы свертывания крови. Выделил и охарактеризовал ряд генов белков, участвующих в процессах свертывания и фибринолиза крови.

тора XIIa, т. е. активированного фактора XII, или с образованием фрагмента, имеющего молекулярную массу 28 000, который, в свою очередь, активирует превращение прекалликреина в калликреин.

Активированный фактор XIIa вместе с калликреином и кинином (последний образуется из высокомолекулярного кининогена при действии калликреина) превращает затем фактор XI (предшественник плазменного тромбопластина) в активную форму XIa (плазменный тромбопластин), последний активирует фактор IX (Кристмас-фактор). Кристмас-фактор получил свое название по имени Стерена Кристмаса — мальчика с нарушениями в системе свертывания крови; из его крови впервые был выделен этот новый белок. Наконец, активированный фактор IXa вместе с еще одним белком — фактором VIII вызывают активацию фактора X (Стюарт-фактор) с образованием фактора Xa и включают, таким образом, общий путь свертывания.

Фактор VIII, называемый *антигемофильным фактором*, является белком-модификатором. Отсутствие его в крови (например, в силу генетического дефекта) вызывает тяжелейшее заболевание — *гемофилию*. При гемофилии нарушение свертывающей способности крови может передаваться по наследству. В частности, широко известен такой исторический факт: английская королева Виктория,

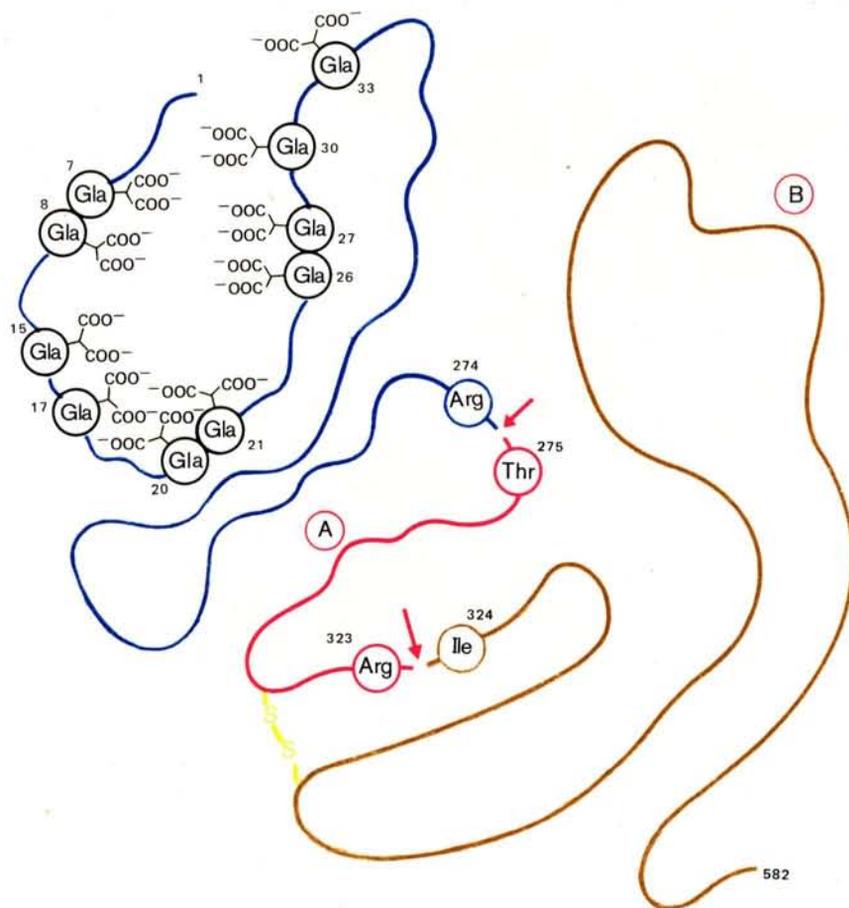


Рис. 132. Схема превращения протромбина в тромбин.

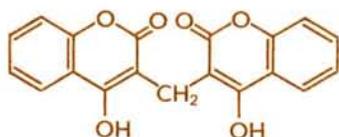
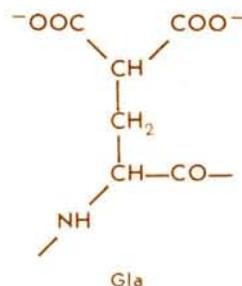
(бывшая носителем гена гемофилии), явилась, сама того не подозревая, причиной распространения этого наследственного заболевания в монархических династиях Пруссии, Испании и России.

Свертывание крови по *внешнему пути* осуществляется весьма быстро (~ 12 с). При повреждении кровеносного сосуда и окружающей ткани в кровь высвобождается *тканевый фактор* липопротеиновой природы, действующий как белок-модификатор. Он вызывает активацию фактора VII (проконвертина) и образование соответствующей протеиназы VIIa (впоследствии этот процесс резко усиливается тромбином по механизму обратной связи), а совместное действие тканевого фактора и фактора VIIa приводит к инициации основного звена процесса свертывания крови: $X \rightarrow Xa \rightarrow \dots$ и т. д.

На заключительных этапах каскада весьма существенным является превращение протромбина (фактора II) в тромбин. Оно происходит под действием протеиназы Xa, но скорость этой реакции увеличивается в десятки тысяч раз благодаря участию еще одного сывороточного белка — акселерина (фактора V).

Протромбин — белок, состоящий из 582 аминокислотных остатков; его протеолитическое расщепление по связям Arg—Thr (274 — 275) и Arg—Ile (323 — 324) приводит к удалению большого N-концевого фрагмента и образованию тромбина, состоящего из соединенных дисульфидной связью цепей A и B (рис. 132).

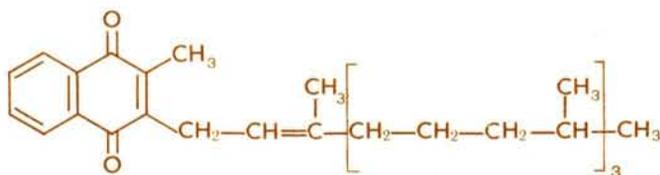
Важной особенностью протромбина является наличие в N-концевом участке его пептидной цепи большого числа (10) остатков γ -карбоксиглутаминовой кислоты (Gla). Именно эти остатки ответственны за связывание ионов Ca^{2+} , являющихся важнейшими кофакторами (известными как фактор IV) на различных стадиях свертывания крови. γ -Карбоксилирование остатков глутаминовой кислоты осуществляется специальной витамин K-зависимой ферментной системой. Отсюда становится понятным, почему витамин K (см. с. 688) необходим для нормального протекания процессов свертывания, а его антагонисты — дикумарол, варфарин и др. часто используются в медицине в качестве антикоагулянтов для предотвращения тромбозов у больных с повышенной свертываемостью крови:



Дикумарол



Варфарин

Витамин K₁

Превращение протромбина в тромбин происходит на фосфолипидных мембранах тромбоцитов, скапливающихся в месте повреждения ткани стенки сосуда. Каталитический комплекс (рис. 133) состоит из ионов Ca^{2+} , связанных с протромбином, факторов Ха и V, а также кислых фосфолипидов; благодаря близости и оптимальной ориентации всех компонентов на мембране процесс ускоряется в $10^4 - 10^5$ раз! При активации протромбина отщепляется N-концевой фрагмент, содержащий Ca^{2+} -связываю-

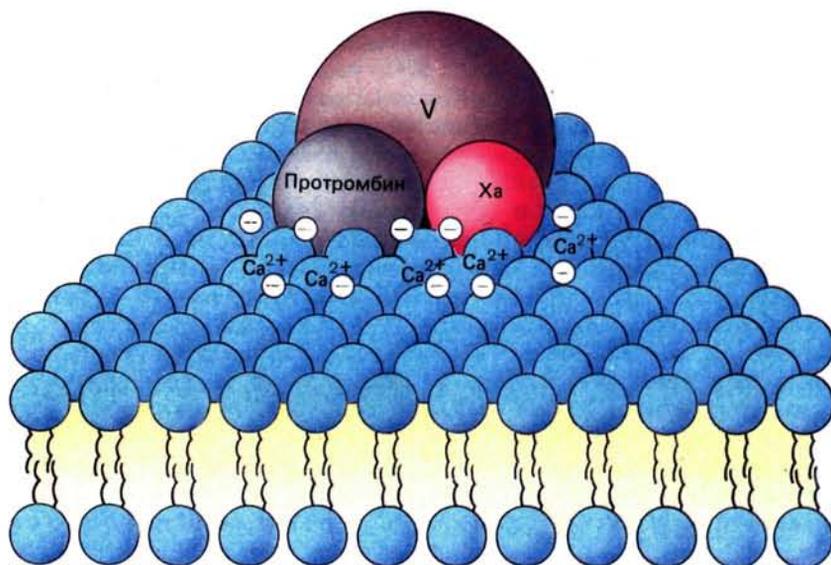


Рис. 133. Мембранный каталитический комплекс активации протромбина.

щие участки. Аналогичный механизм лежит также в основе активации факторов VII, IX, XI, XII.

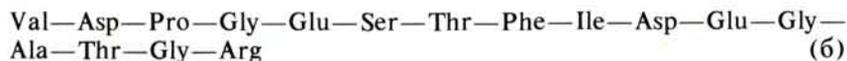
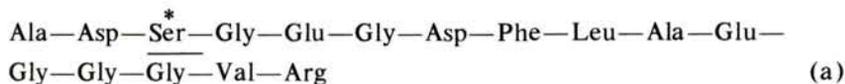
Тромбин — высокоспецифичная протеиназа, во многом аналогичная трипсину. В молекуле фибриногена он расщепляет пептидные связи между остатками Arg и Gly. Аминокислотная последовательность В-цепи тромбина гомологична структуре трипсина, химотрипсина и эластазы, в его активном центре находится фрагмент с характерной для активных центров сериновых протеиназ структурой Gly—Asp—Ser—Gly—Gly—Pro.

Главное звено в свертывании крови — превращение растворимого белка фибриногена (фактор I) под действием тромбина в фибрин-мономер, а затем путем полимеризации последнего — в нерастворимый фибрин-полимер. Фибриноген — высокомолекулярный белок, состоящий из трех пар неидентичных субъединиц — αA , βB и γ , т. е. его структура $(\alpha\text{A}, \beta\text{B}, \gamma)_2$. Совокупность физико-химических данных позволила С. Халлу и Х. Слэйтеру предложить модель пространственной организации фибриногена (рис. 134).

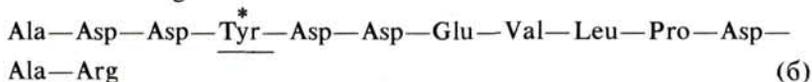
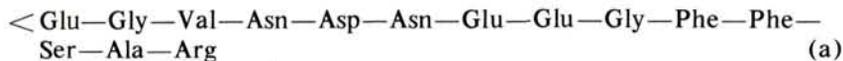
Фибриноген имеет вытянутую форму и напоминает двойную гантель. Длина молекулы фибриногена 46,0 нм; «узлы» в его структуре

стабилизированы дисульфидными связями, но вместе с тем обеспечивают подвижность по принципу своеобразного «шарнира».

В результате протеолитического действия тромбина от фибриногена отщепляются 4 пептида, названные *фибринопептидами*: два А-пептида от двух α А-цепей и два В-пептида от двух β В-цепей. Ниже показаны аминокислотные последовательности фибринопептидов А и В человека (а) и кролика (б):



А



В

Таким образом, фибрин-мономер имеет субъединичную структуру $(\alpha\beta\gamma)_2$; молекула фибрин-мономера спонтанно агрегирует, образуя *фибрин*, имеющий форму длинных нерастворимых нитей (фибрилл). Отщепление фибринопептидов, обладающих большим числом остатков полярных аминокислот, а также заряженными группировками О-фосфосерина Ser^{*} и О-сульфотирозина Tyr^{*}, резко изменяет свойства цепей и способствует агрегации мономеров в фибрин-полимер. Методами электронной спектроскопии и малоуглового рассеяния рентгеновских лучей установлено, что фиб-

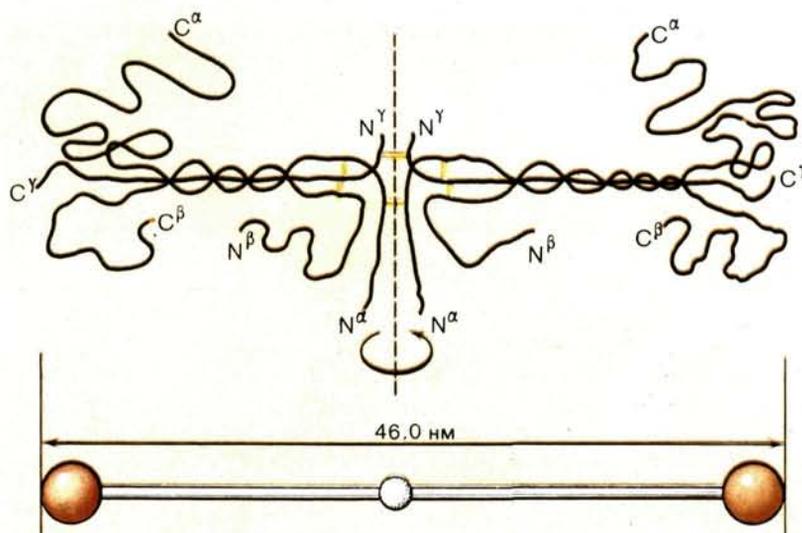
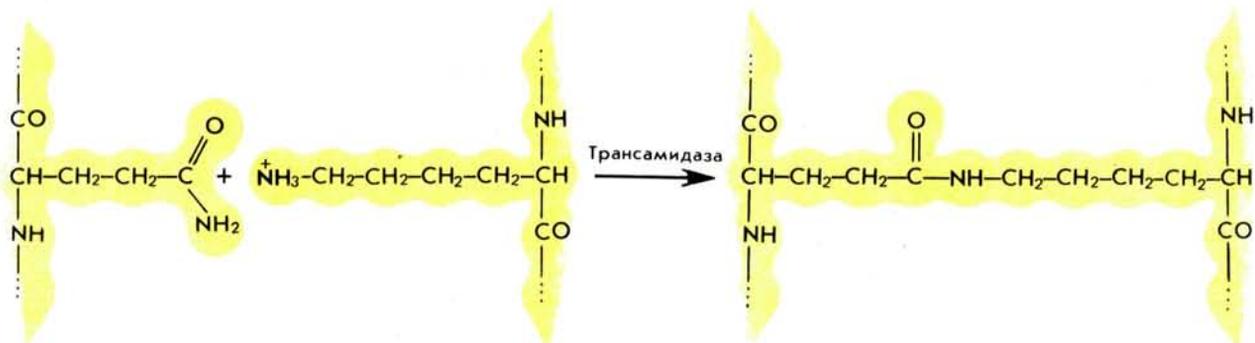


Рис. 134. Модель пространственной структуры фибриногена.

рин имеет периодическую структуру; протяженность повторяющегося участка составляет 23,0 нм (рис. 135).

Сгусток крови, образовавшийся при спонтанной полимеризации мономеров фибрина, вначале является рыхлым и нестойким. Затем он стабилизируется за счет поперечных ковалентных «сшивок» между антипараллельными γ -цепями, в частности путем реакции трансамидирования с участием остатков Gln и Lys:



Если в результате генетических нарушений в крови отсутствует «сшивающий» фермент, то у больных наблюдается повышенная склонность к кровотечениям. Этот фермент (фактор XIII) получил название «трансамидаза» (трансглутаминаза); он активируется тромбином. В процессе участвует еще один белок — фибронектин (гликопротеин, состоящий из двух связанных S—S-связью субъединиц), который «сшивается» с фибрином и способствует процессу свертывания.

Таким образом, в процессе свертывания крови и образования тромба участвует около 20 специфических белков; их характеристики приведены в таблице 10.

Естественно, что для поддержания гомеостаза кроме системы свертывания крови функционирует и противосвертывающая система, или система *фибринолиза* (рис. 131). Она включается в тех случаях, когда свертывание крови нежелательно, а также для

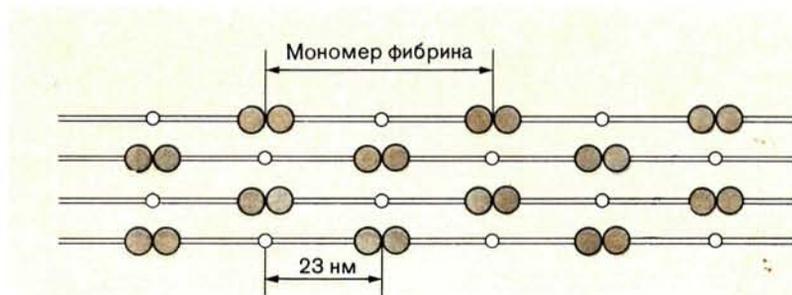


Рис. 135. Структура фибрина.

разрушения свежесформированных тромбов. Наиболее важным из белков этой системы является *плазмин* (фибринолизин) — специфическая протеиназа, разрушающая фибрин. Плазмин образуется в результате активирования *плазминогена* урокиназой. Активация плазминогена может осуществляться также калликреином, специфическим *тканевым активатором плазминогена*, и, кроме того, в результате образования комплекса с бактериальным белком *стрептокиназой*.

Препятствовать тромбообразованию могут также и *белковые ингибиторы протеиназ* — факторов свертывания крови. Среди них наиболее изучен *антитромбин III*; он ингибирует все протеиназы каскада, за исключением VIIa. Действие антитромбина III усиливается полисахаридом *гепарином*.

В заключение следует отметить, что функционирование всех факторов свертывания крови и белков системы фибринолиза осуществляется на основе некоторых общих принципов активации проферментов, или зимогенов (превращение неактивного предшественника в активный фермент). Сравнение структур ряда факторов свертывания крови показывает, что протеолитическим действием во всех случаях обладают С-концевые фрагменты, содержащие около 250 аминокислотных остатков, которые обнаруживают выраженную структурную гомологию как между собой, так и с другими

Т а б л и ц а 10

Белки свертывания крови

Название	Концентрация в плазме (мг/100 мл)	Мол. масса	Субъединичный состав
Фибриноген (фактор I)	200 – 450	340 000	($\alpha A \beta V \gamma$) ₂ , $\alpha A - 63\ 500$ $\beta B - 56\ 000$ $\gamma - 47\ 000$
Протромбин (фактор II)	5 – 10	72 000	1
Тканевый фактор (фактор III)	–	–	–
Ca ²⁺ -ионы (фактор IV)	–	–	–
Плазменный проакселерин (фактор V)	0,01	300 000	1
Сывороточный проакселерин (фактор VI)	–	–	–
Проконвертин (фактор VII)	0,1	56 000	1
Антигемофильный фактор (фактор VIII)	0,1	1 100 000	5 × 200 000
Кристалмас-фактор (фактор IX)	0,1	57 000	1
Стюарт-фактор (фактор X)	0,2	60 000	2 16 000 39 000
Плазменный тромбопластин (фактор XI)	0,6	160 000	2 × 80 000
Фактор Хагемана (фактор XII)	1,5 – 4,5	80 000	1
Фибрин-трансамидаза (фактор XIII)	1 – 4	340 000	2 × 75 000 2 × 88 000
Прекалликреин	5,0	90 000	1
Кининоген	6,0	120 000	–
Плазминоген	10 – 15	87 000	–
Фибронектин	25 – 40	440 000	2
Антитромбин III	25	65 000	



Бернар [Bernard] Клод (1813—1878), французский физиолог, один из основателей современной физиологии, иностранный член-корреспондент Петербургской АН (1860). Окончил Парижский университет (1839); работал в Коллеж де Франс, руководил кафедрой в Парижском университете. Основные работы посвящены изучению физиологии нервной системы, пищеварения и кровообращения. Провел классические исследования функции поджелудочной железы и ее роли в пищеварении. Открыл образование гликогена в печени.



Старлинг [Starling] Эрнест Генри (1866—1927), английский физиолог. Окончил Лондонский университет (1886), в 1899—1923 гг. — профессор этого университета. Основные работы посвящены физиологии пищеварения и кровообращения. Открыл секретин — вещество, вызывающее выделение сока поджелудочной железы. Ввел понятие «гормон».

сериновыми протеиназами (30% инвариантных остатков). N-Концевые домены (также гомологичные у ряда факторов) практически во всех случаях содержат остатки γ -карбоксихлутаминовой кислоты. Они участвуют в закреплении активируемого фактора на поверхности мембран и способствуют значительному ускорению протеолитической активации.

Белки — гормоны

Исторический очерк. Понятие об органе или железе внутренней секреции возникло еще в XIX в. В 1849 г. немецкий физиолог А. Бертольд пересадил семенники кастрированным петухам и обнаружил, что после пересадки у них восстанавливаются утерянные вторичные половые признаки, характерные для самцов. А. Бертольд предположил, что семенники выделяют вещество, необходимое для развития вторичных половых признаков. Понятие «внутренняя секреция» было введено в научную литературу в 1855 г. французским физиологом К. Бернаром. Он назвал железами внутренней секреции органы, выделяющие продукты своего обмена в кровь, и отличал их от желез внешней секреции, выделяющих продукты своего обмена через выводные протоки в полости организма, соединяющиеся с внешней средой. Важным этапом в развитии эндокринологии было открытие, сделанное в 1889 г. немецкими физиологами Й. фон Мерингом и О. Минковским. Они обнаружили, что удаление поджелудочной железы у собаки приводит к диабету — болезни, известной человеку еще с глубокой древности. Развитие диабета предотвращает пересадка собакам с удаленной железой кусочков поджелудочной железы.

В 1902 г. английские физиологи Э. Старлинг и У. Бейлисс установили, что слизистая оболочка двенадцатиперстной кишки при действии на нее соляной кислоты выделяет в кровь вещество, которое стимулирует секрецию сока поджелудочной железой. Э. Старлинг и В. Бейлисс назвали его секретин и позднее доказали, что секретин — лишь первый представитель большой группы еще не открытых биологически активных веществ. В 1905 г. Э. Старлинг предложил называть вещества, относящиеся к этой группе, термином «гормоны» (от греч. *ορμη* — привожу в движение, побуждаю). В последующие десятилетия были выделены и химически охарактеризованы десятки гормонов. В последние годы наука вплотную подошла к пониманию механизма действия их на молекулярном уровне.

Существует несколько признаков, позволяющих выделить гормоны в отдельную группу биологически активных соединений. Согласно классической точке зрения, гормоны — это биологически активные регуляторы эндогенного происхождения, т. е. синтезируемые в организме, а не вносимые в него извне. Гормоны разносятся по организму кровью и действуют на клетки-мишени, удаленные от эндокринных органов.

К белковым гормонам относятся такие важнейшие соединения, как инсулин, гормон роста (соматотропин), некоторые гормоны гипофиза — центральной железы внутренней секреции: тиротропин, гонадотропин, лютропин, липотропин. Еще один белковый гормон — паратгормон — синтезируется в парацитовидных железах.

Взаимодействие гормонов с рецепторами. Для реализации биологического действия гормона необходимо узнавание его клеткой-мишенью, т. е. наличие у нее структур, специфически связывающих данный гормон. Компонент клетки, узнающий гормон и передающий информацию о взаимодействии с ним, называют *рецептором*. Рецепторы должны обладать большим сродством к гормону (константы ассоциации для большинства гормон-рецепторных взаимодействий составляют величины порядка $10^8 - 10^{10} \text{M}^{-1}$), а само взаимодействие должно осуществляться быстро и высокоспецифично. Кроме того, поскольку белковые гормоны не способны свободно пересекать клеточную мембрану, их рецепторы должны быть компонентами плазматической мембраны клеток, локализованными на ее внешней поверхности. Наконец, при связывании гормона рецептор должен обеспечить передачу гормонального сигнала клетке.

Представление о химической природе рецептора на первых этапах получается на основании косвенных данных. Так, анализ влияния структурной модификации гормона на его биологическую активность позволяет делать определенные выводы о свойствах участка связывания в молекуле рецептора. В последнее время широкое распространение получил радиолигандный метод изучения взаимодействия гормон — рецептор, основанный на использовании меченных радиоактивными изотопами гормонов и их структурных аналогов. Метод дает возможность определять такие параметры, как сродство к гормону, количество и локализацию рецепторов в клетке, взаимосвязь между процессами связывания гормона с рецептором и индукцией им биологического ответа клетки. Биологически активные соединения, взаимодействующие с рецепторами, обычно подразделяются на *агонисты* — вещества, связывающиеся с рецепторами и индуцирующие биологический ответ, и *антагонисты* — вещества, связывающиеся с рецепторами, но не вызывающие биологического ответа, а, напротив, препятствующие связыванию и действию агонистов.

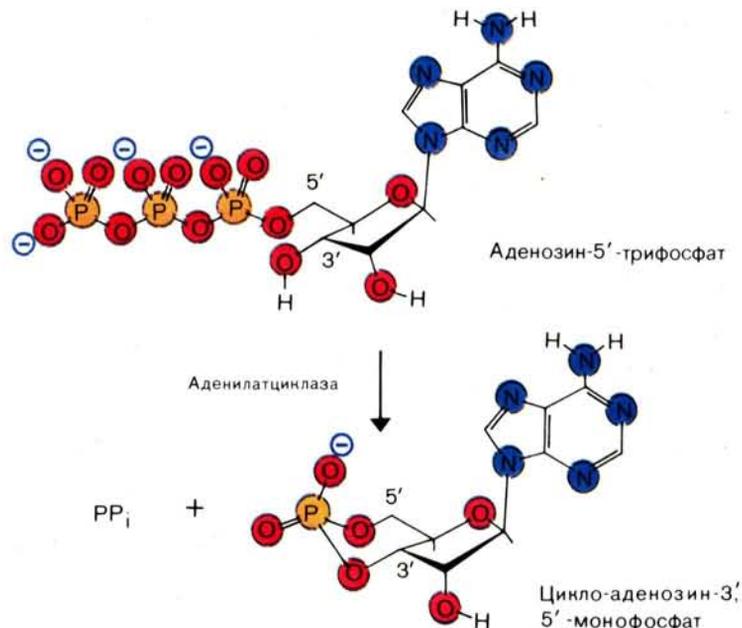
Использование радиолигандного метода позволило приступить к выделению и очистке рецепторов гормонов из мембран. В настоящее время многие рецепторы получены в достаточно гомогенной форме, определены их коэффициент седиментации, молекулярная масса, радиус Стокса, степень гидрофобности и т. д. Рецепторы нескольких гормонов выделены в высокоочищенном виде. Удалось показать, что в большинстве случаев гормональные рецепторы — это гликопротеины.

Структура и свойства аденилатциклазной системы. Взаимодействие гормона с рецептором запускает цепь биохимических реакций, приводящих к характерному ответу клетки. В настоящее время установлено, что в большинстве случаев первым событием, происходящим в клетке после взаимодействия гормонов с их рецепторами, является активация или ингибирование мембранного фермента *аденилатциклазы*, катализирующего реакцию (см. с. 240).

Открытие аденилатциклазы и установление ее роли в механизме действия гормонов связано с именем американского биохимика Э. Сазерленда. В конце 50-х — начале 60-х годов Э. Сазерленд исследовал механизм активации адреналином и глюкагоном гликогенолиза (расщепления гликогена) в клетках печени. Он обнаружил, что эти гормоны непосредственно не влияют на комплекс растворимых ферментов печени, участвующих в гликогенолизе, но после



Сазерленд [Sutherland] Эрл Уилбур (1915—1974), американский биохимик. Окончил медицинскую школу университета им. Дж. Вашингтона в Сент-Луисе (1942), с 1963 г. — профессор медицинской школы Вандербиловского университета в Нашвилле. Основные работы — по изучению углеводного обмена, механизма действия гормонов и лекарственных веществ. Установил, что ключевую роль в передаче гормонального сигнала осуществляет циклическая аденозинмонофосфорная кислота. Лауреат Нобелевской премии по физиологии и медицине (1971).



инкубации мембран клеток печени с глюкагоном или адреналином в присутствии АТФ в среде появляется термостабильный низкомолекулярный фактор, активирующий ферментативный комплекс. Э. Сазерленд идентифицировал его как циклический аденозин-3',5'-монофосфат (сАМР). Затем было выяснено, что в мембранном препарате содержится фермент, синтезирующий сАМР из АТФ и названный Э. Сазерлендом «аденилатциклазой». Как оказалось, фермент присутствует практически во всех клетках животных и имеет универсальное значение.

По современным представлениям, стимулируемая гормонами аденилатциклаза — это мембранная система, состоящая по меньшей мере из 3 индивидуальных компонентов: рецептора, каталитического компонента и регуляторных компонентов одного или нескольких типов, связывающих гуаниновые нуклеотиды. При взаимодействии гормона с рецептором развивается сложная цепь событий, приводящая к увеличению или снижению активности аденилатциклазы в результате сопряжения между компонентами аденилатциклазной системы.

Схематически механизм действия аденилатциклазной системы представлен на рисунке 136. Процесс начинается с взаимодействия гормона с его рецептором, расположенным на внешней стороне клеточной мембраны. При этом индуцируются такие изменения в белке-рецепторе, что он приобретает способность взаимодействовать со следующим компонентом системы — N-белком (N).

В клетках животных обнаружено по крайней мере 2 типа N-белков, осуществляющих сопряжение между рецепторами и аденилатциклазой. Один из них, стимулирующий N-белок (N_s), активирует аденилатциклазу. Другой — ингибирующий N-белок (N_i) — снижает ее активность. Оба N-белка состоят из 3 субъединиц. α-Субъединица N_s имеет молекулярную массу 42 000 — 45 000, β-субъединица — 35 000, а γ-субъединица — около 5000. α-Субъединица N_i имеет молекулярную массу 41 000, а β- и γ-субъединицы N_i очень мало отличаются от соответствующих субъединиц N_s или идентичны им.

N_s -Белок взаимодействует с рецепторами, активирующими аденилатциклазу, N_i -белок — с рецепторами, ее ингибирующими. При образовании тройного комплекса гормон — рецептор — N -белок α -субъединица N -белка обменивает связанный с N -белком GDP на GTP. При связывании GTP с α -субъединицей N_s белок приобретает способность взаимодействовать с каталитическим компонентом аденилатциклазы, мембранным ферментом с молекулярной

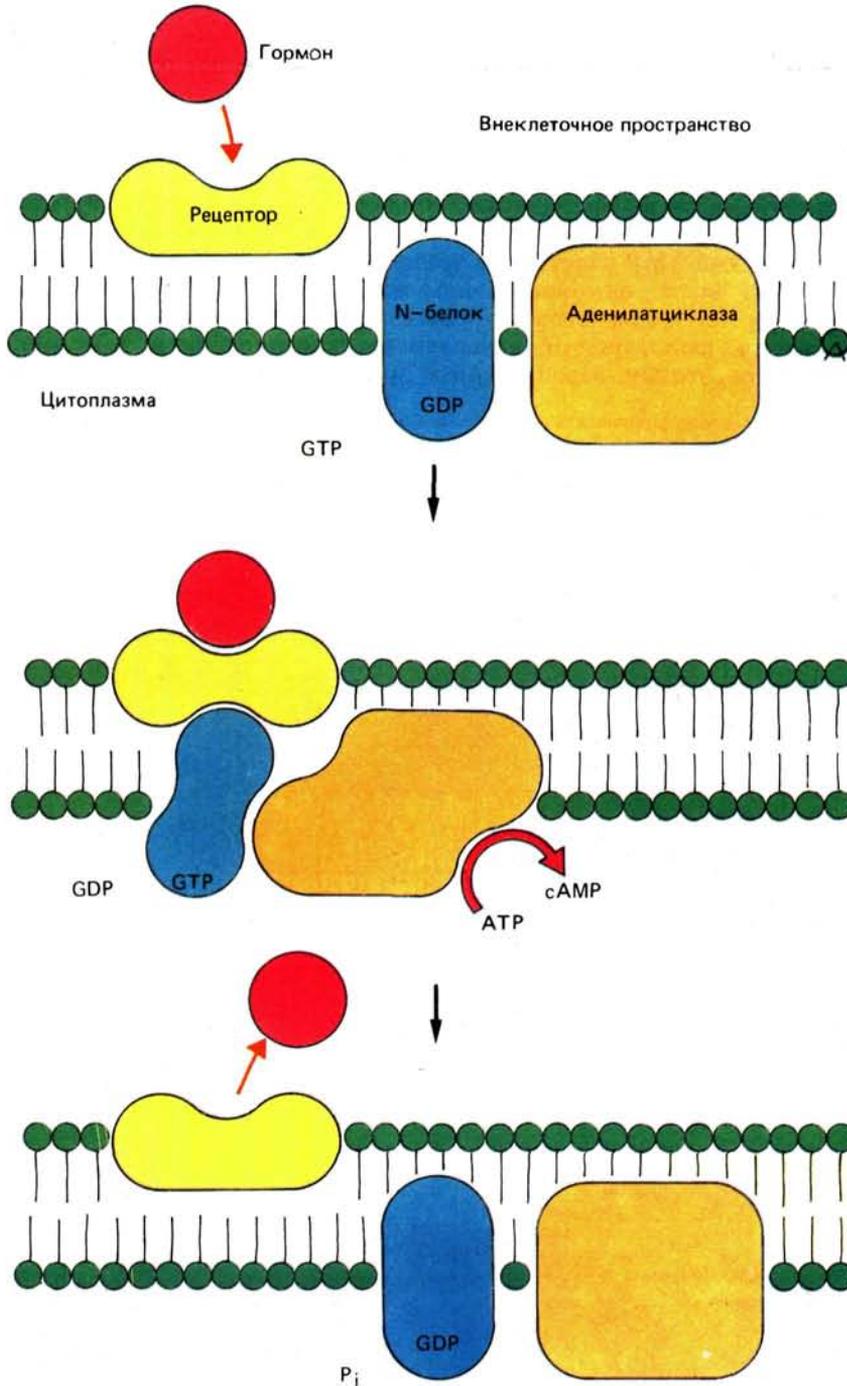


Рис. 136. Механизм действия аденилатциклазы.

массой около 160 000 и активировать ее, при этом возрастает скорость синтеза сАМР. N-Белки обладают ГТФ-азной активностью, гидролиз связанного с α -субъединицей GTP до GDP переводит последнюю в неактивное состояние, и она теряет связь с аденилатциклазой. Система возвращается в исходное состояние, и для ее нового «запуска» необходимо взаимодействие гормона с рецептором. Ингибирование аденилатциклазы происходит при взаимодействии GTP с N_i , индуцированным соответствующим гормоном и рецептором.

Таким образом, взаимодействие гормона с его рецептором индуцирует процесс сопряжения в аденилатциклазной системе, в результате которого активность аденилатциклазы возрастает или снижается, а в клетках изменяется содержание сАМР. Циклический аденозинмонофосфат выполняет роль универсального внутриклеточного «посредника» («второго мессенджера», по Сазерленду), вызывая в клетке цикл превращений, индуцируемых гормоном. В частности, циклический АМР активирует сАМР-зависимые протеинкиназы. Эти ферменты переносят терминальный остаток фосфата АТФ на остатки серина и треонина субстратных белков. Протеинкиназы фосфорилируют многие белки, в частности гистоны, белки рибосом, ферменты, транспортные мембранные белки и т. п. Циклический АМР участвует в реализации биологического действия большого числа гормонов. К ним наряду с упоминавшимися уже адреналином и глюкагоном относятся: паратгормон, тиротропин, лютропин, фоллитропин, кальцитонин, кортикотропин, β -меланотропин, серотонин, вазопрессин и др.

Гормоны могут оказывать свое действие на клетку не только через систему сАМР. В ряде случаев (тиреолиберин, вазопрессин и др.) механизм их действия связан с образованием двух других внутриклеточных «посредников»: инозит-1, 4, 5-трифосфата (IP_3) и диацилглицерина (ДГ). При активации гормонами (рис. 137)

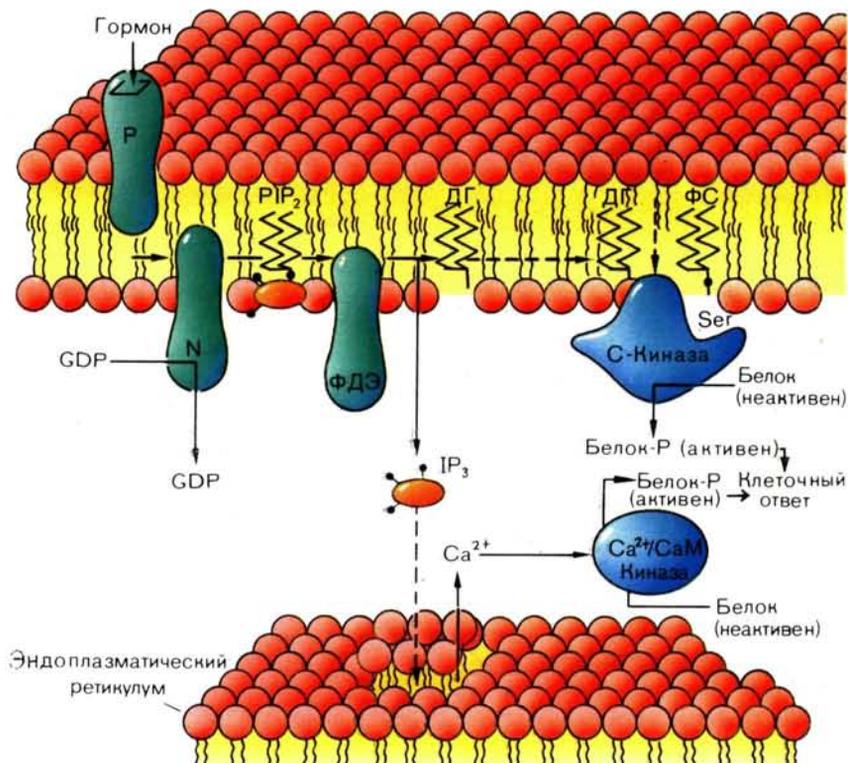
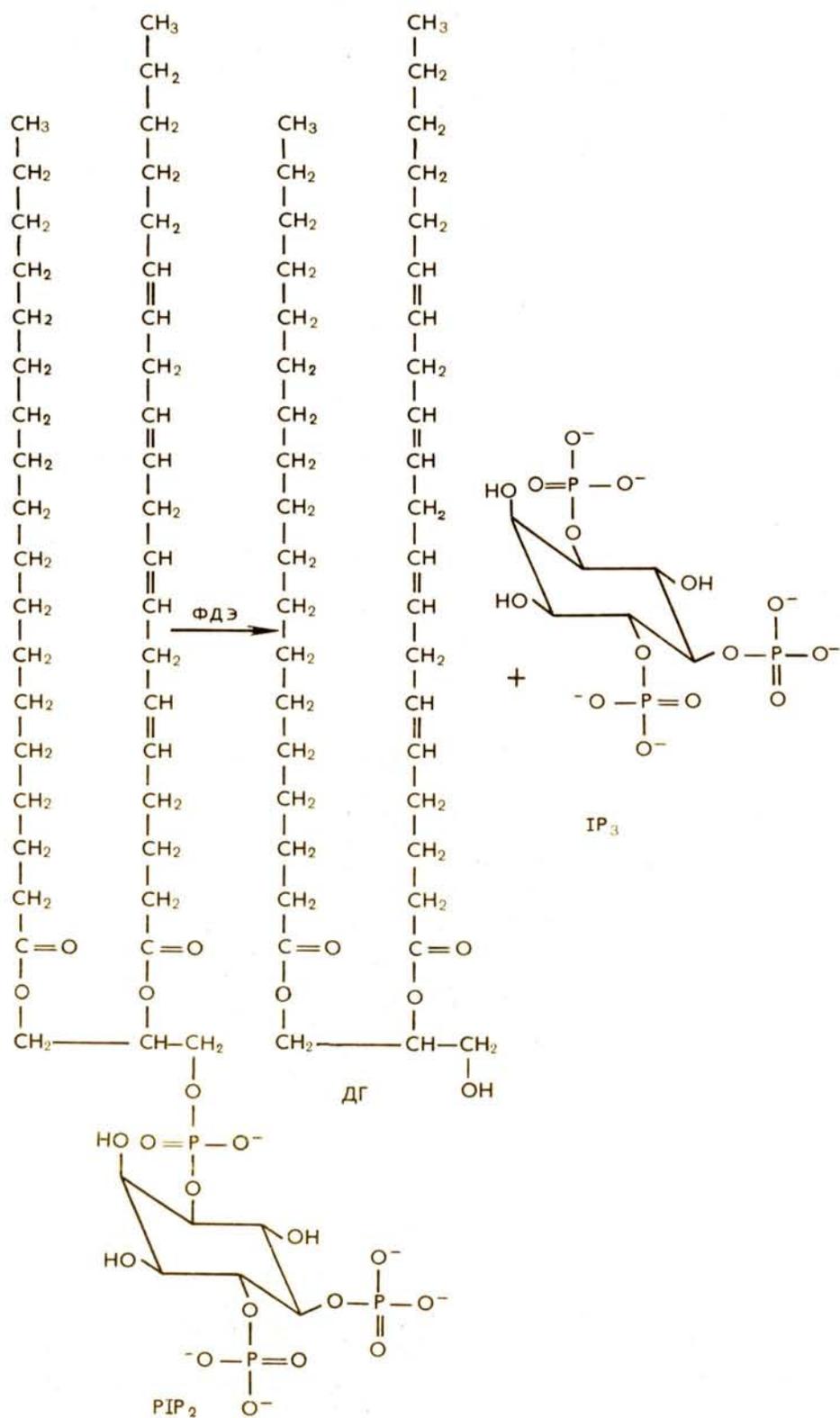


Рис. 137. Инозитный механизм передачи гормонального сигнала.



рецепторов сигнал переносится соответствующим N-белком на фосфодиэстеразу (ФДЭ) фосфатидинозит-4, 5-дифосфата. Этот фермент расщепляет присутствующий в плазматических мембранах в сравнительно небольших количествах фосфатидинозит-4,5-дифосфат (PIP₂) с образованием двух продуктов — IP₃ и ДГ. IP₃ поступает в цитоплазму и индуцирует освобождение из везикул эндоплазматического ретикулума запасенного там Ca²⁺. Кальций активирует протеинкиназу (CaM-киназа). ДГ, оставаясь в мембране, взаимодействует со специфической фосфолипидзависимой протеинкиназой (С-киназой) и при участии мембранного липида фосфатидилсерина активирует ее. Обе киназы фосфорилируют различные белковые субстраты, в основном мембранные белки.

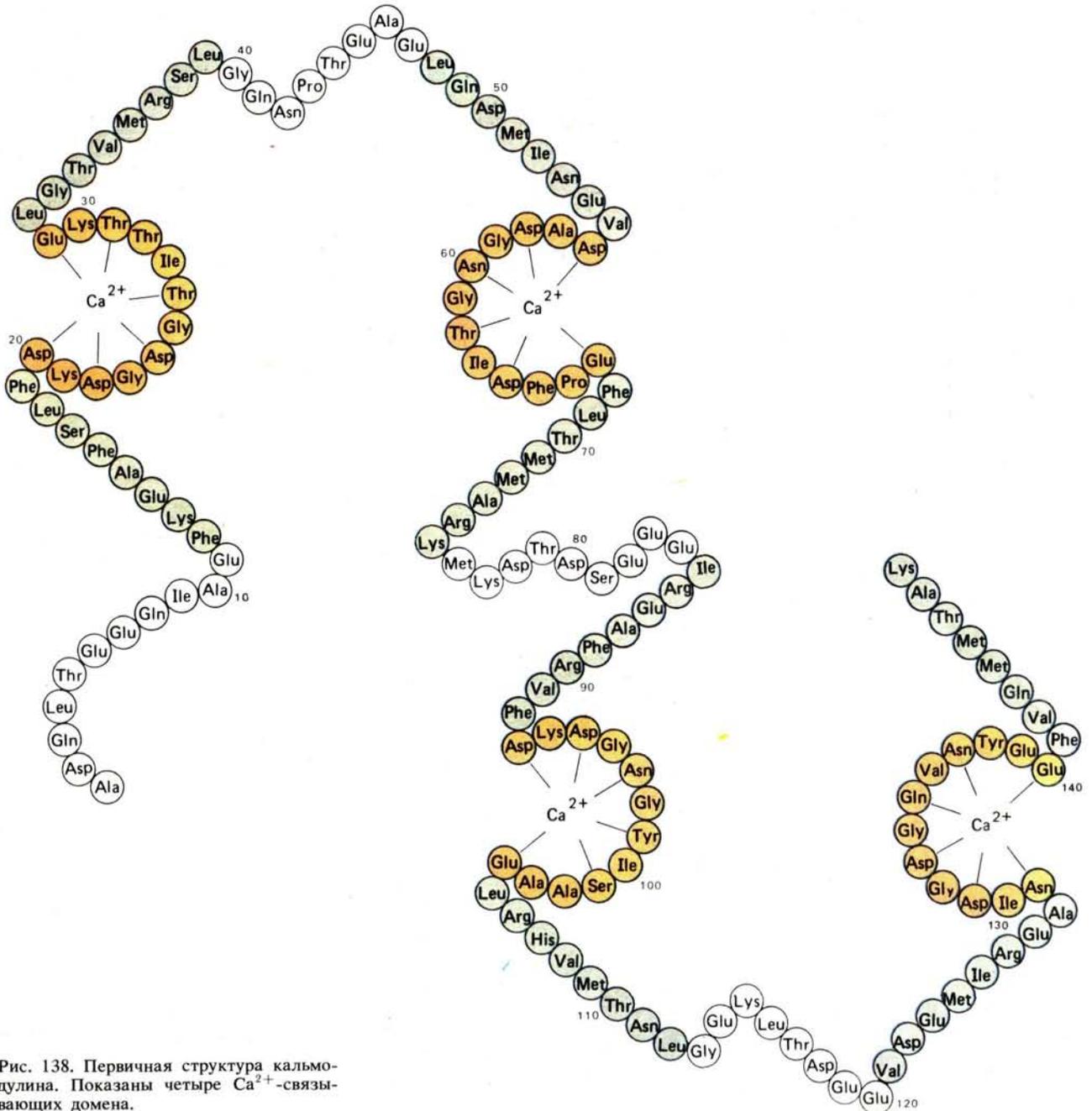
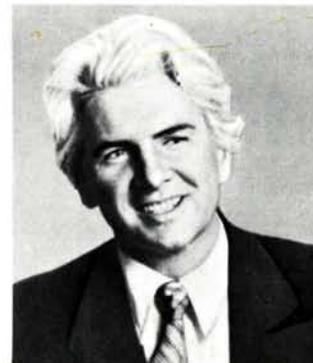


Рис. 138. Первичная структура кальмодулина. Показаны четыре Ca²⁺-связывающих домена.

Действие Ca^{2+} не ограничивается его влиянием на активность протеинкиназы. Концентрация ионов Ca^{2+} в цитоплазме нестимулированной клетки очень низка и в различных клетках составляет 10^{-8} — 10^{-7} М. При взаимодействии гормонов с рецепторами внутриклеточная концентрация Ca^{2+} возрастает в десятки раз, и в результате активируются или ингибируются определенные биохимические процессы в клетке.

В большинстве случаев Ca^{2+} как своеобразный «мессенджер» влияет на клеточные процессы не непосредственно, а в основном через активацию им внутриклеточного рецептора — белка кальмодулина. Этот белок был впервые обнаружен в тканях мозга американским исследователем В. Ченгом по его способности активировать фосфодиэстеразу сАМР. Позднее кальмодулин был найден практически во всех растительных и животных тканях. Кальмодулин из мозга млекопитающих — это белок с молекулярной массой 16 790, его первичная структура была установлена в 1980 г. (рис. 138). Кальмодулин — очень кислый белок (рН 3,9 — 4,3) благодаря тому, что около 30% входящих в его состав остатков приходится на долю аспарагиновой и глутаминовой кислот. Этим и объясняется его высокое сродство к Ca^{2+} . В молекуле кальмодулина 4 связывающих Ca^{2+} центра с высокомолекулярной последовательностью. При связывании Ca^{2+} кальмодулин претерпевает конформационное превращение: α -спирализация молекулы сильно возрастает. В таком измененном состоянии сродство кальмодулина к его мишеням — многочисленным ферментам и другим биологически высокоактивным белкам клетки увеличивается и он оказывается способным влиять на их активность.

Механизм действия многих гормонов пока не установлен с полной достоверностью. Так, например, предполагается, что инсулин действует при посредстве специфического пептида. Имеются данные, что для некоторых гормонов вторичным «мессенджером» служит циклический гуанозин-3',5'-монофосфат.



Блобел (Blobel) Гюнтер (р. 1936), американский биохимик. Окончил Тюбингенский университет (1960), с 1976 г. — профессор Рокфеллеровского университета. Известен работами по изучению механизмов биосинтеза белков. Совместно с Д. Сабатини высказал гипотезу о наличии сигнальной последовательности во вновь синтезируемых белках («сигнальная гипотеза»).

Биосинтез гормонов

Гормональные пептиды и белки после биосинтеза в клетках эндокринных желез должны проникнуть через клеточную мембрану, чтобы выйти в русло крови и достигнуть соответствующей мишени. Однако клеточные мембраны являются непреодолимым барьером для свободной диффузии белков. Каким же образом клетка выводит в кровь белковые молекулы, предназначенные «на экспорт»?

В конце 60-х годов было установлено, что на рибосомах, прикрепленных к эндоплазматическому ретикулуму, происходит синтез белков, выводимых клеткой во внешнюю среду. Американские ученые Г. Блобел и Д. Сабатини в 1975 г. выдвинули гипотезу, объясняющую, каким образом происходит перенос через мембрану белков, синтезируемых на таких рибосомах (рис. 139). Синтез секретируемого белка начинается с особой последовательности аминокислот, названной Г. Блобелом «сигнальным пептидом». Эта последовательность необходима для фиксации рибосомы на мембране, откуда следует, что сигнальный пептид должен иметь гидрофобный характер. Взаимодействие сигнального пептида с мембранами вызывает агрегацию определенных рецепторных белков, связывающих большую субъединицу рибосомы и формирующих



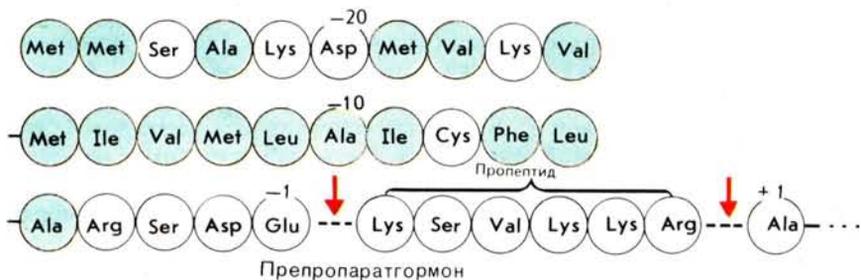
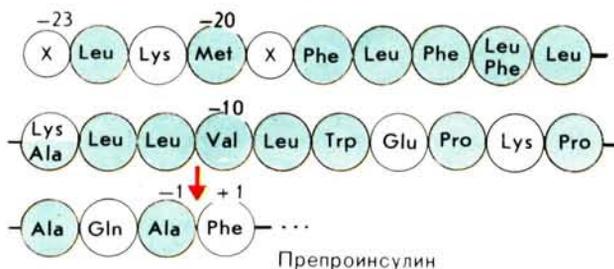
Сабатини (Sabatini) Дэвид Д. (р. 1931), американский биохимик. Образование получил в университете в Росарио (Аргентина), с 1972 г. — профессор Нью-Йоркского университета. Основные работы — по изучению биохимии и структурной организации внутриклеточных органелл. Совместно с Г. Блобелом высказал гипотезу о наличии сигнальной последовательности во вновь синтезируемых белках. Идентифицировал белки, участвующие в связывании рибосом на мембране эндоплазматического ретикулума.



Бест (Best) Чарльз Герберт (р. 1899), канадский физиолог. Окончил Торонтский университет (1921), с 1941 г. — руководитель отдела медицинских исследований Института им. Ф. Бантинга и Ч. Беста Торонтского университета. Основные работы посвящены изучению обмена веществ и физиологии гормонов. Совместно с Дж. Маклеодом и Ф. Бантингом выполнил работы по выделению инсулина (1922) и разработке метода лечения сахарного диабета.

канал, через который проходит сигнальный пептид и весь синтезируемый белок. После фиксации рибосомы на мембране и образования канала необходимость в сигнальной последовательности исчезает и она отщепляется особым ферментом — «сигнальной пептидазой». Поэтому при определении последовательности аминокислот в полностью синтезированной молекуле гормона не удастся обнаружить в нем наличие сигнального пептида. После завершения синтеза белковой цепи рибосома освобождается и уходит в цитоплазму, канал ликвидируется, а полностью синтезированный пептид или белок оказывается вне матрикса цитоплазмы. Он поступает в аппарат Гольджи или в запасующие гранулы, а затем секретируется клеткой в среду. Г. Блобел назвал белок, имеющий в своем составе сигнальный пептид, прегормоном.

Гипотеза Г. Блобела была подтверждена последующими исследованиями. Прегормоны с сигнальными пептидами были идентифицированы при изучении биосинтеза белка в *бесклеточных системах*, т. е. в системах, содержащих рибосомы, все необходимые кофакторы для синтеза белка и иРНК, кодирующую, естественно, всю белковую последовательность, включая сигнальный пептид. В таких системах отсутствуют мембраны и связанная с ними сигнальная пептидаза, поэтому отщепления сигнального пептида не происходит. Ниже приведены сигнальные последовательности некоторых белковых гормонов:



Анализ сигнальных последовательностей этих и некоторых других секретируемых белков показал, что для них, как и предполагал Г. Блобел, характерно довольно высокое содержание гидрофобных аминокислотных остатков.

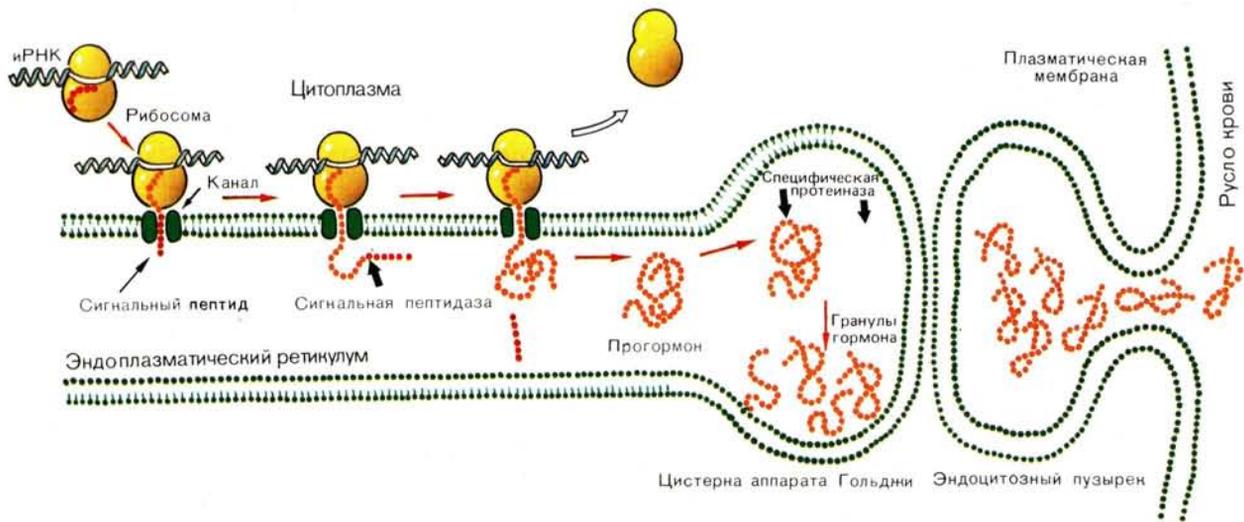


Рис. 139. Схема биосинтеза белковых гормонов.

Многие гормоны синтезируются в виде предшественников — прогормонов. В виде прогормонов образуются инсулин, паратгормон, липотропин и другие белки. Функциональная роль дополнительной последовательности аминокислот у предшественников гормонов, по-видимому, в каждом случае своя. Например, наличие С-пептида в проинсулине необходимо для правильной укладки в пространстве молекулы в процессе ее биосинтеза, для замыкания соответствующих дисульфидных связей между будущими цепями А и В инсулина. Значительные размеры С-пептида связаны с тем, что он должен увеличивать растворимость синтезированной молекулы инсулина. После того как вновь синтезированная молекула проинсулина из-за высокой растворимости диффундирует в цистерны аппарата Гольджи, там происходит отщепление С-пептида ферментом трипсинового типа и образуется уже окончательная форма молекулы — биологически активный инсулин.

Представители белковых гормонов

Инсулин. Еще в конце XIX в. опыты по удалению поджелудочной железы и ее обратной пересадке показали, что поджелудочная железа является источником фактора, снижающего уровень глюкозы в крови. Природа этого гипогликемического фактора в течение десятилетий оставалась неизвестной, и лишь в 1922 г. канадские ученые Ф. Бантинг и Ч. Бест выделили его в чистом виде, а в 1926 г. Дж. Абель получил кристаллический инсулин.

Интерес к инсулину объясняется его важной ролью в организме. При нарушениях, связанных с отсутствием или недостатком инсулина, развивается заболевание, получившее название «сахарный диабет». При этом заболевании содержание глюкозы

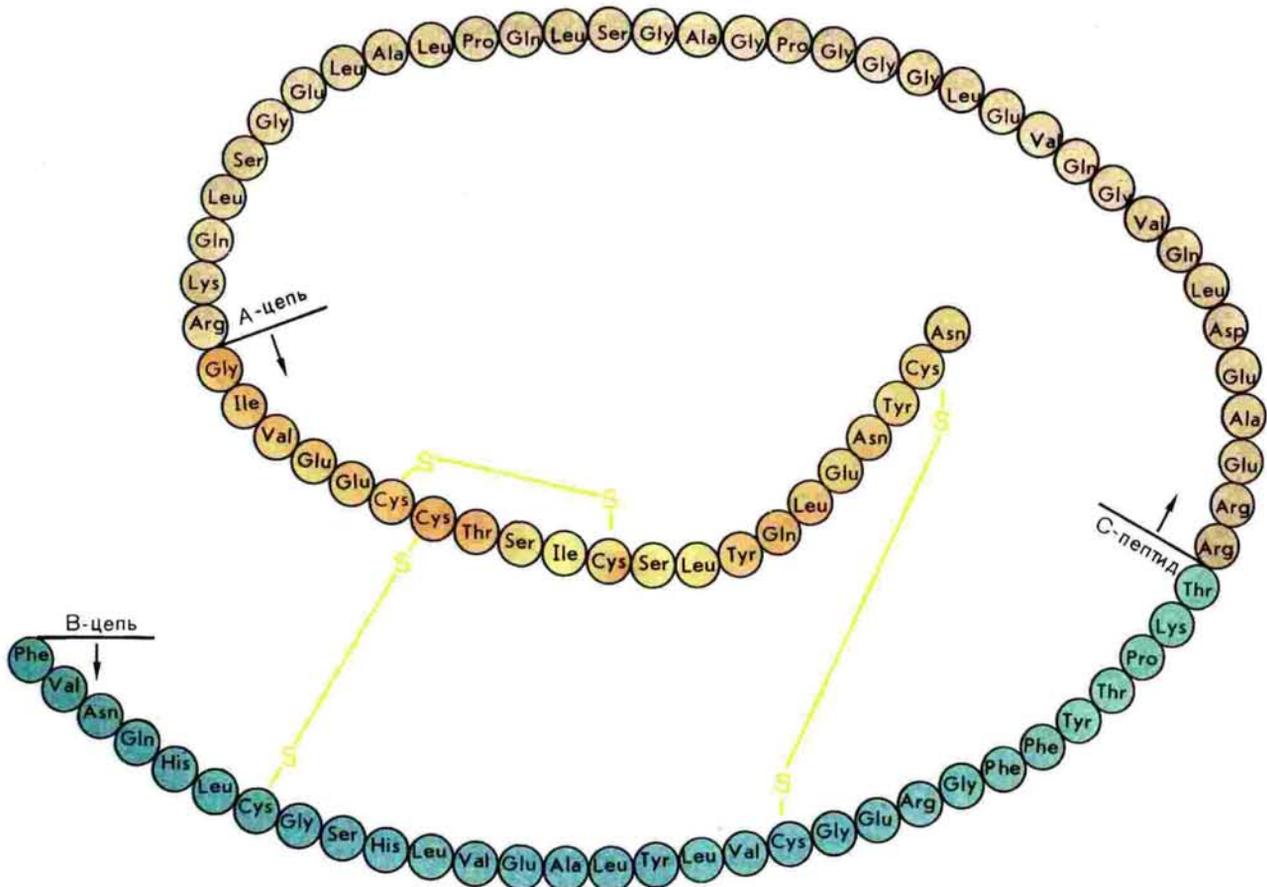
в крови повышается, в результате чего развиваются патологические процессы. Диабет — широко распространенное заболевание. Основным антидиабетическим средством в настоящее время является инсулин крупного рогатого скота и свиней. Инсулин регулярно вводят больным в виде инъекций. Однако во многих случаях чужеродный инсулин вызывает у больных аллергические реакции. Поэтому остро стоит задача искусственного получения инсулина человека в количествах, достаточных для терапевтических целей.

Инсулин синтезируется в β -клетках поджелудочной железы, образующих так называемые островки Лангерганса. Первоначально он образуется в форме прегормона — одноцепочечного белка, состоящего из 109 остатков аминокислот. При отщеплении 23-членного сигнального пептида получается проинсулин (рис. 140). Проинсулин быстро расщепляется специфическими ферментами, в результате чего образуется молекула инсулина, состоящая из 2 полипептидных цепей, соединенных двумя дисульфидными связями. Цепь А содержит 21, а цепь В — 30 аминокислотных остатков (рис. 141).

Инсулин был первым белком, у которого была расшифрована полная первичная структура. Инсулин — также первый белок, полученный с помощью химического синтеза. В ходе получения инсулина были синтезированы отдельно две его цепи, а затем проведено замыкание дисульфидных мостиков (см. с. 158).

Хотя химический синтез инсулина человека был осуществлен, он не мог служить основой для промышленного производства гормона из-за его малой экономичности. В настоящее время инсулин человека получают в практических целях двумя способами.

Рис. 140. Первичная структура проинсулина человека.



Один из них основан на превращении инсулина свиньи в инсулин человека (эти гормоны отличаются только одним С-концевым аминокислотным остатком) с помощью «полусинтетического» метода (см. с. 151). Именно так производят инсулин на предприятиях фирмы «Novo» (Дания).

Второй способ получения инсулина связан с использованием методов геной инженерии (см. с. 381).

Способность инсулина к кристаллизации позволила детально изучить пространственную структуру его молекулы методом рентгеноструктурного анализа. Группа ученых из Оксфорда (Великобритания), возглавляемая Д. Ходжкин, получила в 1969 г. детальную карту гексамера инсулина, содержащего 2 атома цинка. Все 6 молекул инсулина в гексамере имеют почти одинаковую конформацию (рис. 142).

Рецептор инсулина — первый мембранный рецептор, который удалось солиubilизировать из мембран без потери им способности связывать гормон. Это было сделано в 1972 г. американским исследователем П. Куатрекасасом. В настоящее время рецептор инсулина выделен из самых различных тканей млекопитающих. Рецептор из мембран печени состоит из двух типов полипептидных цепей — α -цепи с молекулярной массой 135 000 и β -цепи (95 000). Формула рецептора инсулина — $(\alpha\beta)_2$, все его цепи связаны дисульфидными мостиками.

Соматотропин. Соматотропин (СТГ, гормон роста) — белковый гормон, вырабатываемый передней долей гипофиза, секреция которого регулируется факторами гипоталамуса. Соматостатин инги-



Бантинг (Banting) Фредерик Грант (1891—1941), канадский физиолог. Окончил Торонтский университет (1910), с 1923 г. — профессор отдела медицинских исследований в Институте им. Ф. Бантинга и Ч. Беста Торонтского университета. Основные работы — по изучению обмена веществ и внутренней секреции, физиологии пищеварения. Совместно с Ч. Бестом выделил из поджелудочной железы инсулин (1922) и разработал метод лечения сахарного диабета этим гормоном. Лауреат Нобелевской премии по физиологии и медицине (1923, совместно с Дж. Маклеодом).

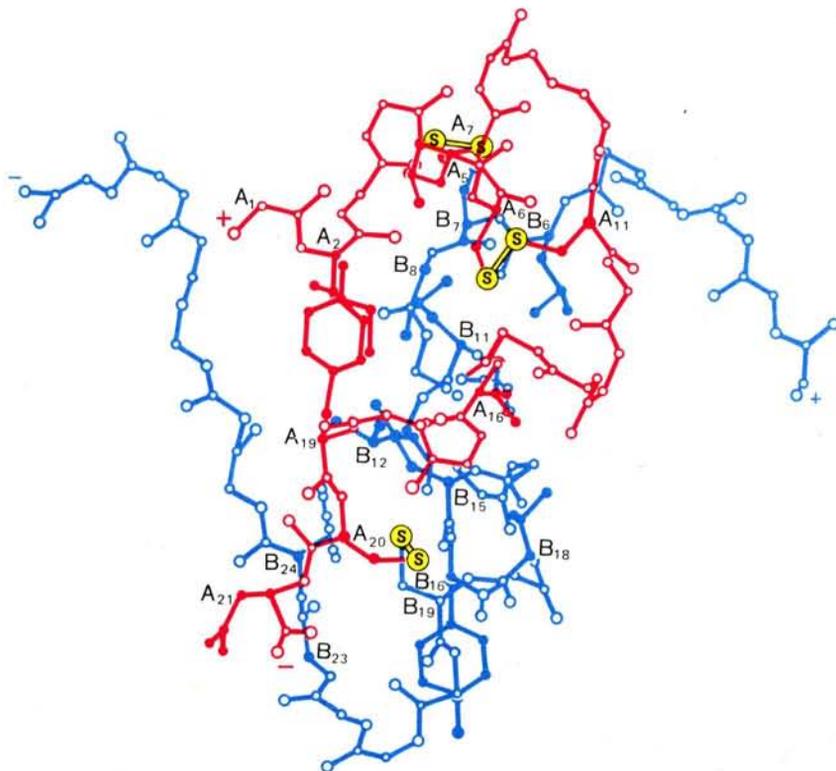


Рис. 141. Ход цепей А и В в молекуле инсулина.

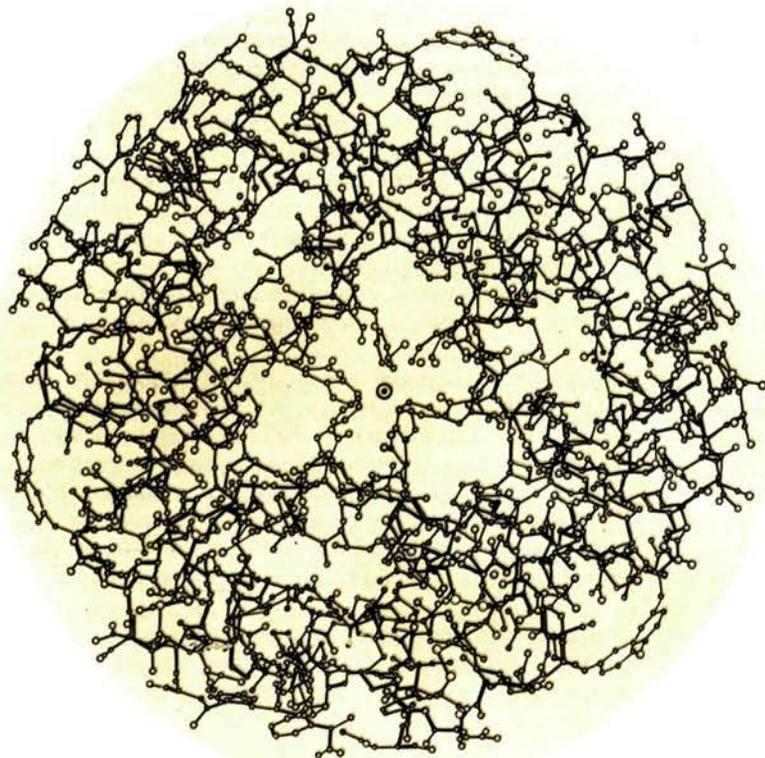


Рис. 142. Структура гексамера 2-цинк-инсулина, определенная на основании рентгеноструктурного анализа кристаллов инсулина свиньи.

Рис. 143. Аминокислотная последовательность соматотропинов человека (сверху) и быка.

Phe-Pro-Thr-Ile-Pro-Leu-Ser-Arg-Leu-Phe-Asp-Asn-Ala-Met-Leu-Arg-Ala-His-Arg-Leu-His-Gln-Leu-Ala-Phe
 Ala-Phe-Pro-Ala-Met-Ser-Leu-Ser-Gly-Leu-Phe-Ala-Asn-Ala-Val-Leu-Arg-Ala-Gln-His-Leu-His-Gln-Leu-Ala-Ala
 25
 Asp-Thr-Tyr-Gln-Glu-Phe-Glu-Glu-Ala-Tyr-Ile-Pro-Lys-Gln-Gln-Lys-Tyr-Ser-Phe-Leu-Gln-Asn-Pro-Gln-Thr
 Asp-Thr-Phe-Lys-Glu-Phe-Glu-Arg-Thr-Tyr-Ile-Pro-Glu-Gly-Gln-Arg-Tyr-Ser — Ile-Gln-Asn-Thr-Gln-Val
 50
 Ser-Leu-Cys-Phe-Ser-Glu-Ser-Ile-Pro-Thr-Pro-Ser-Asn-Arg-Glu-Glu-Thr-Gln-Gln-Lys-Ser-Asn-Leu-Gln-Leu
 Ala-Phe-Cys-Phe-Ser-Glu-Thr-Ile-Pro-Ala-Pro(Thr)Gly-Lys-Asn-Glu-Ala-Gln-Gln-Lys-Ser-Asp-Leu-Glu-Leu
 75
 Leu-Arg-Ile-Ser-Leu-Leu-Leu-Ile-Gln-Ser-Trp-Leu-Glu-Pro-Val-Gln-Phe-Leu-Arg-Ser-Val-Phe-Ala-Asn-Ser
 Leu-Arg-Ile-Ser-Leu-Leu-Leu-Ile-Gln-Ser-Trp-Leu-Gly-Pro-Leu-Gln-Phe-Leu-Ser-Arg-Val-Phe-Thr-Asn-Ser
 100
 Leu-Val-Tyr-Gly-Ala-Ser-Asn-Ser-Asp-Val-Tyr-Asp-Leu-Leu-Lys-Asp-Leu-Glu-Glu-Gly-Ile-Gln-Thr-Leu-Met
 Leu-Val-Phe-Gly-Thr-Ser-Asp-Arg — Val-Tyr-Glu-Lys-Leu-Lys-Asp-Leu-Glu-Glu-Gly-Ile-Leu-Ala-Leu-Met
 125
 Gly-Arg-Leu-Glu-Asp-Gly-Ser-Pro-Arg-Thr-Gly-Gln-Ile-Phe-Lys-Gln-Thr-Tyr-Ser-Lys-Phe-Asp-Thr-Asn-Ser
 Arg-Glu(Val)Glu-Asp-Gly-Thr-Pro-Arg-Ala-Gly-Gln-Ile-Leu-Lys-Gln-Thr-Tyr-Asp-Lys-Phe-Asp-Thr-Asn-Met
 (Leu)
 150
 His-Asn-Asp-Asp-Ala-Leu-Leu-Lys-Asn-Tyr-Gly-Leu-Leu-Tyr-Cys-Phe-Arg-Lys-Asp-Met-Asp-Lys-Val-Glu-Thr
 Arg-Ser-Asp-Asp-Ala-Leu-Leu-Lys-Asn-Thr-Gly-Leu-Leu-Ser-Cys-Phe-Arg-Lys-Asp-Leu-His-Lys-Thr-Glu-Thr
 175
 Phe-Leu-Arg-Ile-Val-Gln-Cys-Arg — Ser-Val-Glu-Gly-Ser-Cys-Gly-Phe
 Tyr-Leu-Arg-Val-Met-Lys-Cys-Arg-Arg-Phe-Gly-Glu-Ala-Ser-Cys-Ala-Phe
 191

бирует секрецию СТГ, а стимулирует ее пока не идентифицированный рилизинг-фактор гипоталамуса.

Соматотропин относится к группе анаболических гормонов. При введении его в организм животного с гипофизарной недостаточностью наблюдается усиление роста скелетных костей и других тканей, усиливается синтез белка и секреция молока. Проявление физиологического эффекта соматотропина связано с появлением в крови особых белков, которые называются соматомединами — веществами, опосредующими действие СТГ. Основным местом синтеза соматомединов, как выяснилось в последнее время, является печень. Поэтому печень можно отнести к периферической эндокринной железе, секретирующей вторичные гормоны (в частности, соматомедины) в ответ на действие продукта центральной железы — гипофиза.

Гормоны роста разных видов животных представляют собой одноцепочечные полипептиды, содержащие около 200 аминокислотных остатков. Видовая специфичность первичной структуры резко выражена — например, соматотропины человека и быка содержат 191 аминокислотный остаток, но различны в них всего 63 остатка (рис. 143).

Первичные структуры соматотропинов и пролактина (см. ниже) были расшифрованы в 1970 — 1972 гг. американским химиком Чо Хао Ли. В 1970 г. осуществлен полный химический синтез соматотропина (Д. Ямаширо и Ч. Ли). В настоящее время во многих странах, в том числе в СССР, гормоны роста человека и животных получают на основе методов генетической инженерии и применяются, в частности, в медицине для лечения карликовости, заживления ран и переломов костей, а в сельском хозяйстве — для увеличения продуктивности скота.

Пролактин. В аденогипофизе образуется еще один белковый гормон, близкий по химическим и биологическим свойствам соматотропину, — пролактин, или лактогенный гормон. Он значительно эффективнее стимулирует лактацию, чем соматотропин, и помимо этого обладает широким спектром биологического действия. Пролактин влияет на рост органов и тканей животных, регулирует вод-



Куатрекасас [Cuatrecasas] Педро (р. 1936), американский биохимик испанского происхождения. Окончил Вашингтонский университет в Сент-Луисе (1958), с 1972 г. — профессор фармакологии и экспериментальной терапии. Основные научные интересы связаны с проблемами молекулярной нейробиологии и мембранной рецепции. Выделил (1972) из мембран рецептор инсулина.





Ли [Li] Чо Хао (р. 1913), американский химик и биохимик. Окончил Нанкинский университет в Китае (1933), с 1950 г. — профессор биохимии и экспериментальной эндокринологии Калифорнийского университета в Беркли (США). Внес значительный вклад в изучение гормонов гипофиза. Выделил, установил строение и осуществил химический синтез таких гормонов, как АКТГ, липотропный гормон, гормон роста.

ный и солевой баланс, стимулирует развитие вторичных половых признаков.

Секреция пролактина находится под контролем гипоталамических факторов, в частности, пока не охарактеризованного химически пролактин-релизингибирующего фактора. Секрецию пролактина стимулируют тиролиберин и другие факторы. Молекула пролактина (овцы) состоит из 198 аминокислот и содержит 3 дисульфидных мостика.

Гликопротеиновые гормоны аденогипофиза. Наиболее изучены три гормона аденогипофиза, обладающие субъединичным строением и, кроме белковой части, имеющие в своем составе углеводы: тиротропный гормон (тиротропин, ТСГ), лютеинизирующий гормон (лютропин, ЛГ) и фолликулостимулирующий гормон (фоллитропин, ФСГ). Эти гормоны проявляют разную биологическую активность, но имеют сходную структуру. Фоллитропин стимулирует созревание фолликулов у самок и сперматогенез у самцов. Лютропин вызывает у самок разрыв фолликулов с образованием желтого тела и стимулирует секрецию женских половых гормонов — эстрогена и прогестерона, а у самцов — секрецию тестостерона. Основная мишень действия тиротропина — щитовидная железа, он усиливает потребление железой иода из крови, биосинтез гормонов щитовидной железы (тироксина и три-иодтиронина) и секрецию этих гормонов в кровь.

Молекулы гликопротеиновых гормонов состоят из двух субъединиц, обозначаемых α и β , причем α -субъединицы всех гормонов одного вида животных идентичны, а β -субъединицы отличаются друг от друга. Пептидная цепь α -субъединицы у разных видов содержит 89 — 96 аминокислотных остатков, а β -субъединицы — 115 — 119 аминокислотных остатков. Обе цепи содержат углеводы.

Структуры гликопротеиновых гормонов аденогипофиза были установлены американскими исследователями Дж. Пирсом (1970) и Чо Хао Ли (1972 — 1974).

Паратгормон. Концентрация ионов кальция в крови меняется в очень узких пределах. Такое постоянство обеспечивается двумя гормонами. Один из них — паратгормон (ПТГ) — увеличивает уровень Ca^{2+} в крови, а другой — кальцитонин — уменьшает его. Одновременно оба этих гормона влияют на уровень фосфата в крови, потому что основным депо кальция в организме является скелет, где Ca^{2+} запасается в форме фосфата.

Паратгормон синтезируется и секретируется небольшими эндокринными железами — паращитовидными железами. Паратгормон быка представляет собой небольшой одноцепочечный белок, содержащий 84 аминокислотных остатка:

```

1                               10                               20
Ala-Val-Ser-Glu-Ile-Gln-Phe-Met-His-Asn-Leu-Gly-Lys-His-Leu-Ser-Ser-Met-Glu-Arg-
Val-Glu-Trp-Leu-Arg-Lys-Lys-Leu-Gln-Asp-Val-His-Asn-Phe-Val-Ala-Leu-Gly-Ala-Ser-
Ile-Ala-Tyr-Arg-Asp-Gly-Ser-Ser-Gln-Arg-Pro-Arg-Lys-Lys-Glu-Asp-Asn-Val-Leu-Val-
Glu-Ser-His-Gln-Lys-Ser-Leu-Gly-Glu-Ala-Asp-Lys-Ala-Asp-Val-Asp-Val-Leu-Ile-Lys-
Ala-Lys-Pro-Gln
84

```

Он синтезируется в форме прогормона. Про-ПТГ имеет 6 дополнительных аминокислотных остатков в N-концевой части молекулы. Биологическая активность ПТГ определяется в основном N-конце-

вой частью его полипептидной цепи. Синтетический фрагмент ПТГ (1 — 34) обладает значительной биологической активностью, но укорочение его с N-конца всего на 1 аминокислотный остаток приводит к полной потере биологической активности.

Действие ПТГ на ткани связано с активацией им аденилат циклазы. Увеличение уровня сАМР в клетках усиливает активность системы транспорта Ca^{2+} .

Белки мышц и соединительных тканей

В этом разделе рассматриваются белковые системы, участвующие в организме в выполнении механической работы, а следовательно, в движении. Движение — важнейший признак живого, и принципы работы двигательных систем клетки и организма во многом уникальны. Перемещение хромосом в процессе деления клеток, проникновение вируса в бактерию, транспорт веществ через мембрану, наконец, движение микроорганизмов и работа мышц — это лишь немногие примеры трансформации химической энергии в энергию движения, заслуживающие подражания при создании машин и механизмов будущего.



Эдсалл (Edsall) Джон Тилестон (р. 1902), американский биохимик. Окончил Гарвардский университет (1923), с 1928 г. работает в этом же университете. Известен фундаментальными работами по исследованию структуры мышц, открыл миозин.

Структура мышц

Мышцы представляют собой специализированную волокнистую ткань, основу которой образуют сильно вытянутые многоядерные клетки. Внутри такой клетки многочисленные волокна *миофибрилл* окружены плотной сетью мембранных структур — *саркоплазматическим ретикулумом* и омываются клеточной жидкостью — *саркоплазмой*. В то время как саркоплазма содержит главным образом растворимые ферменты и другие вещества, обеспечивающие функционирование мышц (фосфоорилаза, альдолаза, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа, гликоген, креатинфосфат, АТР, Ca^{2+} и др.), миофибриллы построены из нерастворимых *толстых и тонких белковых нитей*, непосредственно участвующих в мышечном сокращении. Толстые нити состоят из белка миозина, а главным компонентом тонких нитей является белок актин; комплекс миозина и актина называют *актомиозином*.

Исторический очерк. Фундаментальные работы по исследованию структуры мышц были выполнены в 30-е годы XX в. Дж. Эдсаллом, который открыл главный белок мышцы — миозин. В 1939 г. В. А. Энгельгардт и М. Н. Любимова установили, что миозин обладает ферментативной активностью и способен гидролизовать АТР. Следующий важный шаг был сделан в Венгрии А. Сент-Дьёрдьи, который в 1942 г. обнаружил другой главный компонент мышцы — актин и показал, что актомиозиновый комплекс сокращается при действии АТР. Детальный структурный анализ мышечного волокна был проведен в 50 — 60-х годах Х. Хаксли, предложившим теорию «скользящих нитей», являющуюся основой современных представлений о механизме мышечного сокращения.



Энгельгардт Владимир Александрович (1894—1984), советский биохимик, академик АН СССР (1953) и АМН СССР (1944). Окончил Московский университет (1919), организатор и директор Института молекулярной биологии АН СССР (1959—1984). Основные работы посвящены изучению закономерностей превращения фосфорных соединений в процессах клеточного обмена. Установил (1939, совместно с М. Н. Любимовой), что миозин обладает свойствами аденозинтрифосфатазы. Открыл дыхательное фосфорилирование на уровне клетки (1931). Герой Социалистического Труда (1969), лауреат Государственных премий СССР (1943, 1979).

При детальном анализе структуры миофибрилл методом фазово-контрастной микроскопии в них выявляется наличие повторяющихся звеньев (рис. 144). Функциональная единица миофибриллы (между Z-линиями) называется *саркомером*. Темные полосы принято называть А-дисками (анизотропными), а светлые — I-дисками (изотропными); центральная часть А-полосы является менее плотной (Н-зона) и рассекается М-линией.

Молекулярная структура миофибрилл характеризуется регулярной упаковкой толстых (диаметр 15 нм) и тонких (диаметр 7 нм) белковых нитей. При сокращении мышцы тонкие и толстые нити скользят друг относительно друга, ширина А-полосы остается постоянной, а зоны Н и I уменьшаются (рис. 145). При максимальном сокращении концы толстых нитей приходят в контакт с Z-ли-

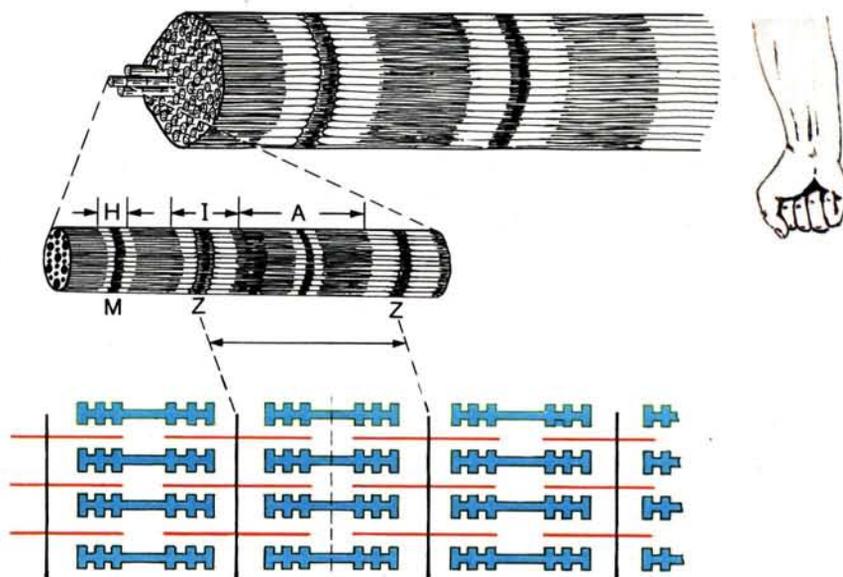


Рис. 144. Структура миофибрилл.

ниями саркомера. При расслаблении мышцы ее структура возвращается в первоначальное состояние. Сокращение инициируется электрическим импульсом, который вызывает деполяризацию плазматической мембраны (сарколеммы) мышечной клетки, это приводит к изменению внутриклеточной концентрации Ca^{2+} . Источником энергии при мышечном сокращении является гидролиз АТФ миозином. Синтез АТФ происходит за счет креатинфосфата, а также в результате осуществления гликолиза (гликогенолиза) и окислительных процессов.

Основой толстой нити является молекула миозина. Этот белок имеет молекулярную массу 480 000 и построен из двух тяжелых (по 200 000) и четырех легких (по 20 000) цепей (рис. 146).

При ограниченном протеолизе миозин расщепляется на ряд фрагментов. В частности, при обработке трипсином образуются легкий меромиозин (ЛММ) и тяжелый меромиозин (НММ) (А. Сент-Дьёрдьи, 1953). Тяжелый меромиозин обладает АТФ-

азной активностью и способен связываться с актином. Входящие в его структуру глобулярные «головки» миозина ответственны за ферментативную активность и связывание актина.

Толстая нить образуется путем агрегации молекул миозина, причем палочкообразные участки миозина формируют стержень нити, а «головки» оказываются ориентированными наружу по спирали (рис. 147, 148). Взаиморасположение толстых и тонких нитей изображено на рисунке 148; толстая нить осуществляет контакт с 6 соседними тонкими нитями. Тонкая нить состоит из мономеров актина (так называемого G-актина), упакованных в двунитчатые спиральные структуры (F-актин, рис. 149). В канавках спирали F-актина расположены молекулы тропомиозина, а через каждые 40 нм вдоль нити локализованы молекулы тропонина.

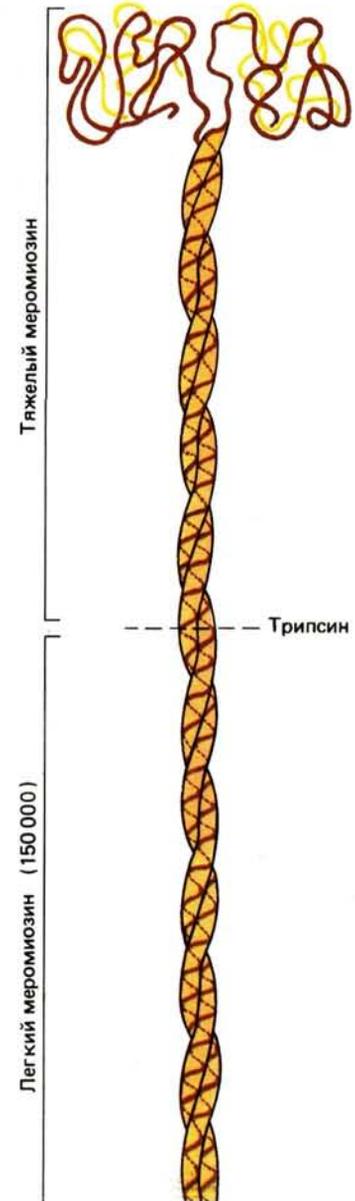
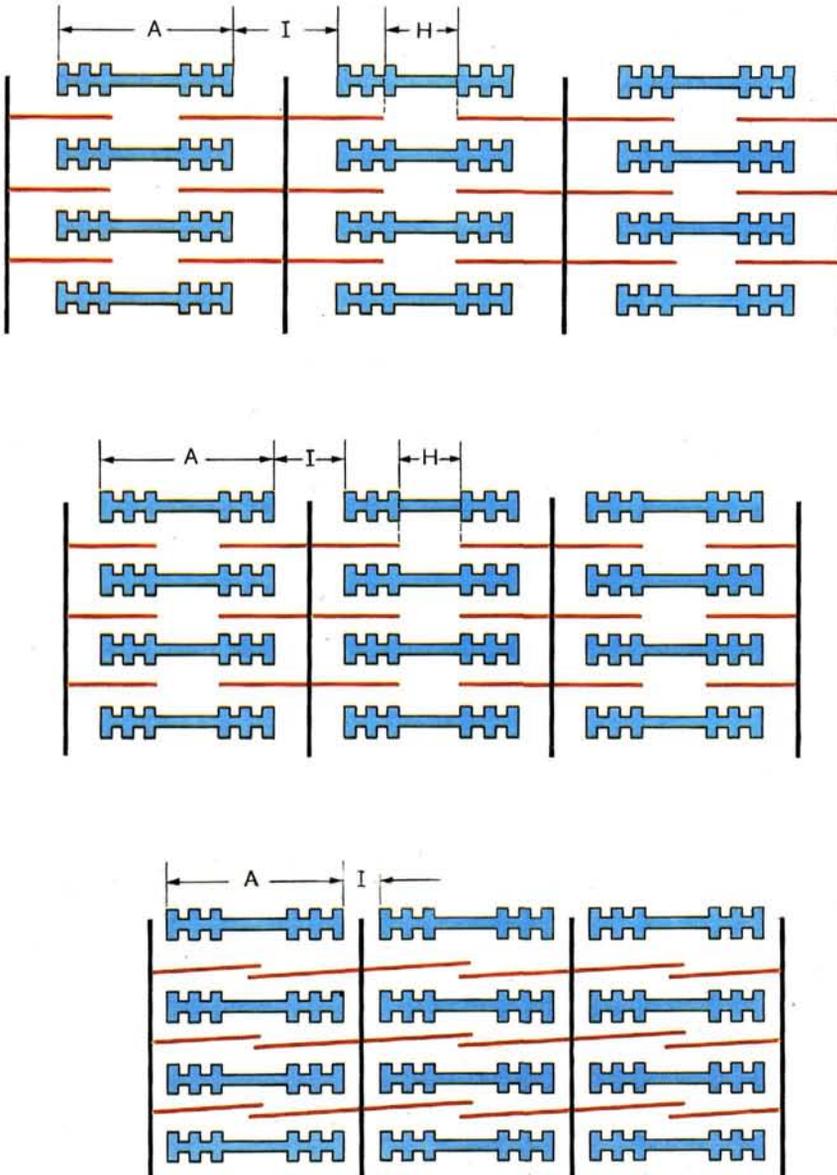


Рис. 146. Строение молекулы миозина.

Рис. 145. Схема скольжения нитей при мышечном сокращении.

и тропомиозин образуют комплекс, функциональная роль которого заключается в регуляции взаимодействия актина с миозином (с участием Ca^{2+}).

В процессе сокращения происходит чередование стадий образования и разрушения «сшивок» между головками молекул миозина и G-актиновыми участками тонких нитей.

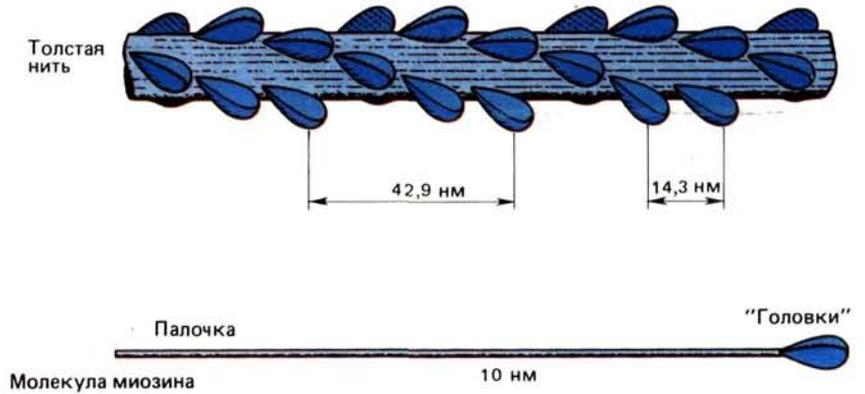


Рис. 147. Структура толстой нити миофибрилл.

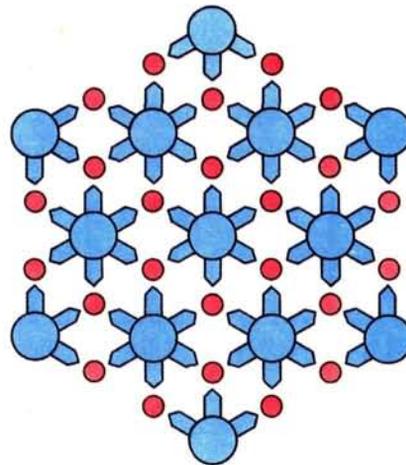


Рис. 148. Взаиморасположение толстых и тонких нитей миофибрилл.

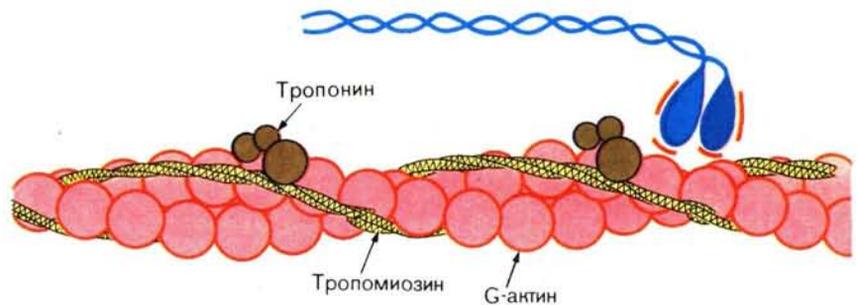


Рис. 149. Строение тонкой нити; образование комплекса с головкой миозина.

В таблице 11 представлена характеристика основных белков миофибрилл (включая минорные компоненты).

Таблица 11

Характеристика основных белков миофибрилл

Название белка	Локализация	Молекулярная масса	Субъединичный состав
Миозин	Толстая нить	480 000	2 × 200 000 4 × 200 000
С-Белок	Толстая нить	140 000	—
Актин	Тонкая нить	46 000	—
Тропомиозин В	Тонкая нить	130 000	2 × 65000
Тропонин	Тонкая нить	80 000	37 000 (Т) 24 000 (I) 18 000 (С)
α -Актинин	Z-Структура	180 000	2 × 90000
β -Актинин	”	”	”
М-Белок	М-Структура	180 000	2 × 90000

Коллаген

Волокна коллагена очень прочны, они входят в состав сухожилий, кожи, хрящей, кровеносных сосудов. Коллаген, составляющий около одной трети всех белков позвоночных, относится к *фибрилярным белкам*, образующим длинные нити — фибриллы. К таким белкам принадлежат также α -кератины волос и шерсти, фиброин шелка; основой их служат сплетенные вместе α -спиральные пептидные цепи. Впервые рентгенограммы фибриллярных белков были изучены в начале 30-х годов У. Астбери.

Коллагеновые нити образуются путем плотной укладки (четырьмя уступами) молекул *тропоколлагена* (рис. 150). Отдельные тро-

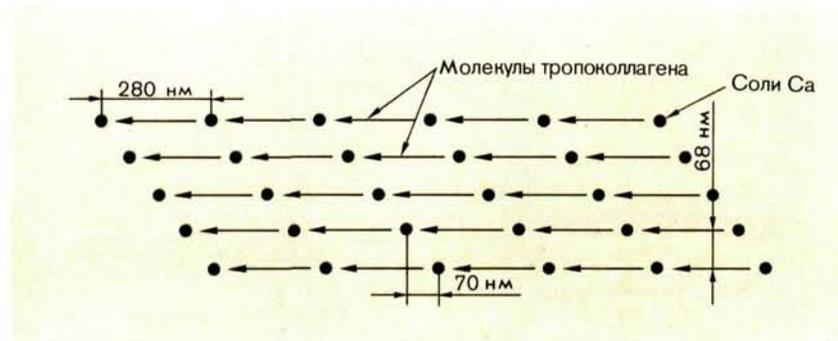
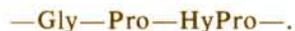


Рис. 150. Структура коллагеновой нити.

поколлагеновые молекулы не связаны между собой, в «разрывах» между ними нередко кристаллизуется фосфат кальция (например, в зубах и костях).

Тропоколлаген — основная структурная единица коллагена, имеет молекулярную массу 285 000 и состоит из трех полипептидных цепей — двух $\alpha 1$ и одной $\alpha 2$. Эти цепи находятся в особой, присущей лишь коллагену конформации и образуют тройную спираль. Аминокислотный состав цепей необычен и характеризуется высоким содержанием остатков глицина и пролина, а также наличием остатков 4-гидроксипролина и 5-гидроксизина. В аминокислотной последовательности цепей практически на каждом третьем месте находится остаток глицина, и наиболее часто повторяющийся фрагмент пептидной цепи имеет структуру



Полная первичная структура цепей определена в 1979 г. К. Кюном.

Биосинтез коллагена, осуществляемый в фибробластах, протекает весьма сложно. Сначала его цепи синтезируются на полисомах в виде предшественников, образуя проколлаген. В частности, предшественники $\alpha 1$ - и $\alpha 2$ -цепей имеют молекулярную массу свыше 120 000 каждый. Пептидные цепи затем гидроксилируются и гликозилируются посттрансляционно, как это схематически показано на рисунке 151.

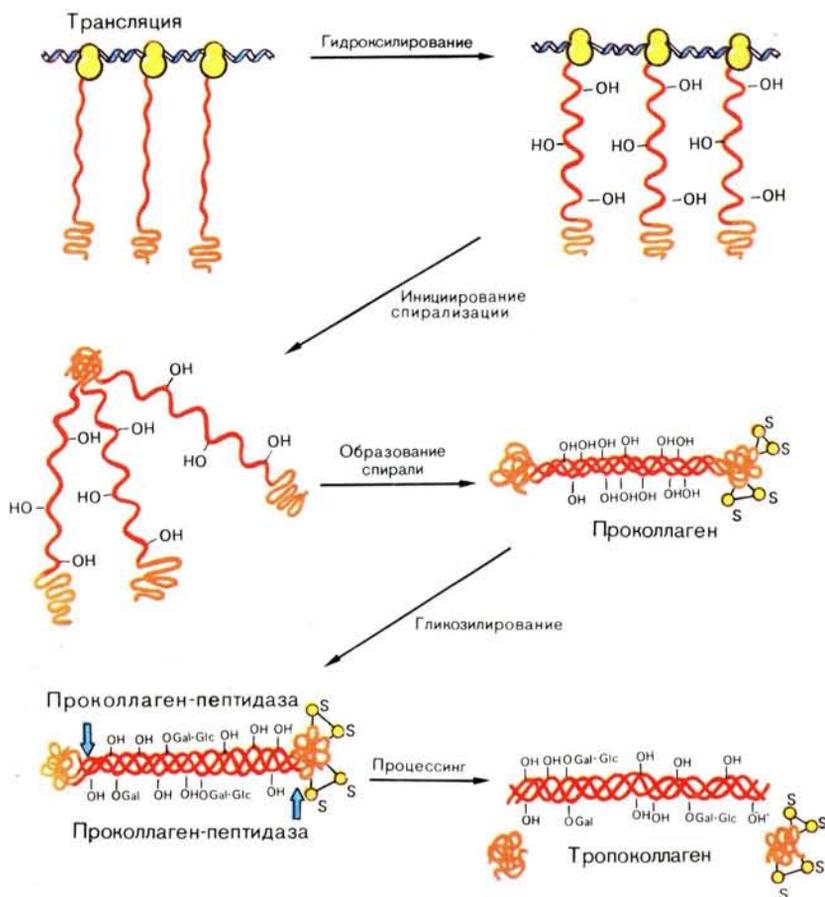


Рис. 151. Схема биосинтеза коллагена.

Гидроксилирование проколлагена осуществляется с участием фермента *проколлаген-гидроксилазы*, использующего в качестве кофактора витамин С (аскорбиновую кислоту) (см. с. 684). Коллаген, который синтезируется при недостатке или отсутствии витамина С, оказывается в существенной степени лишенным гидроксильных групп и соответственно О-гликозильных остатков, что препятствует образованию полноценных волокон и является причиной часто встречающихся поражений кожи, десен, ломкости сосудов и других признаков, характерных для цинги.

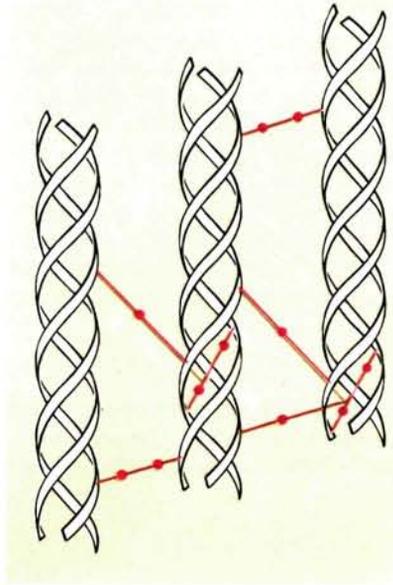
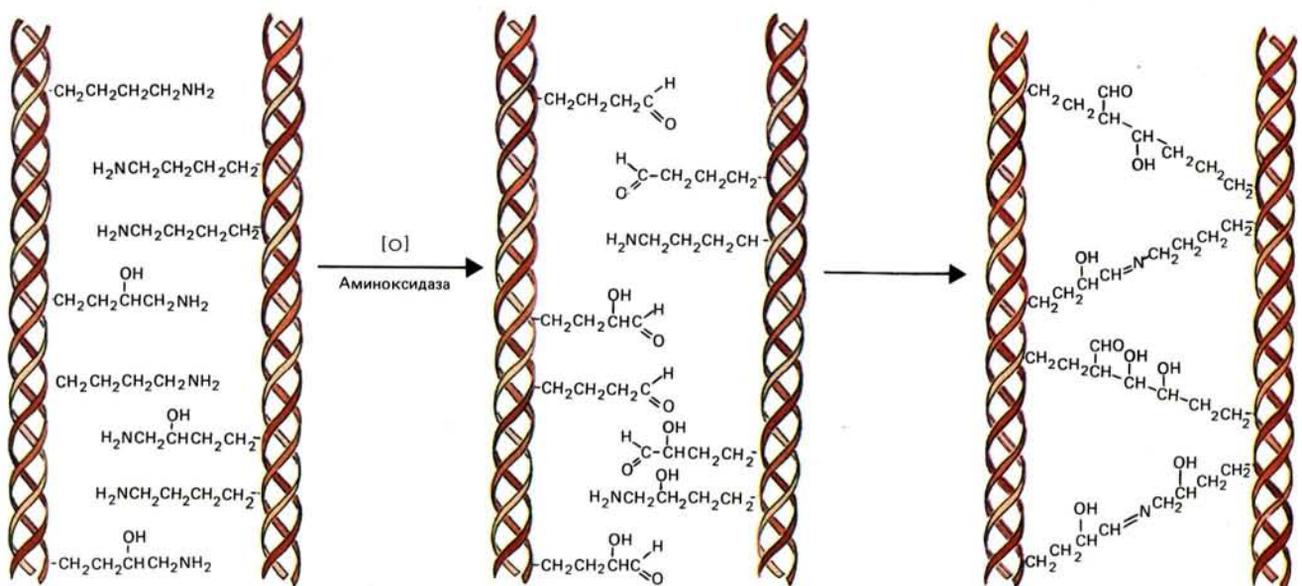


Рис. 152. Межмолекулярные и внутримолекулярные «сшивки» в коллагене.

Рис. 153. Типы ковалентных «сшивок» в коллагене.



Прочность коллагеновых волокон (нить сечением около 1 мм выдерживает нагрузку более 10 кг) во многом достигается за счет дополнительных ковалентных «сшивок» между молекулами тропоколлагена (рис. 152).

Установлено, что в образовании «сшивок» участвуют главным образом остатки Lys и HyLys: их ферментативное окисление приводит к соответствующим альдегидам, вступающим в альдольную конденсацию или дающим «шиффовы основания» (рис. 153).

Строение образующихся «мостиков» устанавливается после их восстановления боргидридами металлов или гидролитического расщепления. Интересно, что употребление животными особого сорта гороха (*Lathyrus odoratus*) приводит к *латиризму*, т. е. неправильному развитию скелета, обусловленному поражением коллагенсодержащих тканей. Причиной является высокое содержание в горохе β-аминопропионитрила $\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CN}$, являющегося мощным ингибитором Ca^{2+} -активируемой аминоксидазы; в результате не образуются альдегидные группировки и резко уменьшается процент «сшивок». Чистота «сшивок» зависит от функции и возраста ткани: коллагеновое волокно в мягких тканях (язык, хвост и т. п.) «сшито» слабо, а в случае ахиллесова сухожилия — прочно; молодые ткани имеют сравнительно небольшой процент «сшивок» и по этой причине оказываются лучше растворимыми.

Коллаген способен разрушаться под действием специфических ферментов-коллагеназ. В частности, одна из коллагеназ микробного происхождения (*Clostridium histolyticum*) гидролизует в коллагене связь



что приводит к тяжелому поражению соединительных тканей; это наблюдается при газовой гангрене. Существуют и тканевые коллагеназы, которые действуют специфично, вызывая ограниченный протеолиз коллагена.

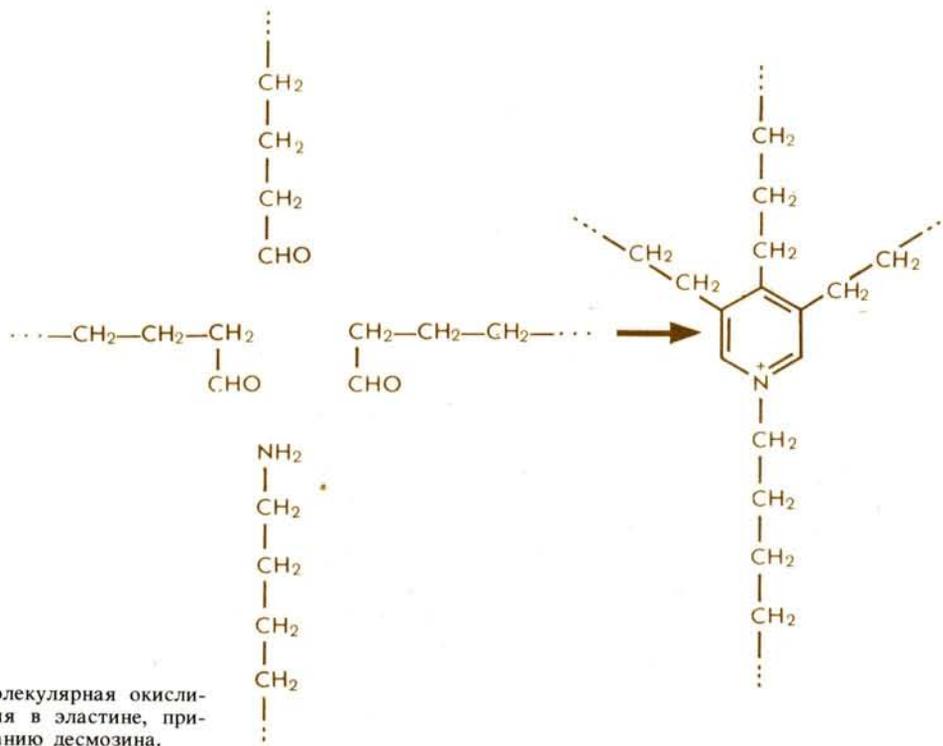


Рис. 154. Внутримолекулярная окислительная конденсация в эластине, приводящая к образованию десмозина.

Близким аналогом коллагена является *эластин* — белок эластичных волокон, содержащийся в стенках кровеносных сосудов, в связках, в тканях шеи у гусей и лебедей. Характерное свойство эластина — способность его растягиваться в несколько раз. В структурном отношении он аналогичен коллагену, однако имеет мало остатков HyPro и совсем не содержит остатков HyLys . Процент «сшивок» в молекуле эластина исключительно высок, встречаются и многокомпонентные «сшивки» в виде узлов, как, например, в случае образования производных десмозина (рис. 154). Эластиновые волокна не расщепляются трипсином, но медленно гидролизуются пепсином при $\text{pH}2$.

Коллаген и эластин практически нерастворимы в воде. При экстракции нерастворимого коллагена водой при 100°C получают растворы *желатина*, которые при охлаждении образуют гель.

Биологическая роль пептидов

Нейропептиды и пептидные гормоны

Нейропептиды

Нейропептидами принято называть пептиды, обнаруженные в мозге и способные влиять на функции центральной нервной системы. К этой же группе относятся пептиды гипоталамуса и гипофиза, обладающие широким спектром биологического действия. Несомненно, что число нейропептидов значительно, но лишь немногие из них изучены в достаточной мере. Большинство нейропептидов синтезируется нервными клетками.

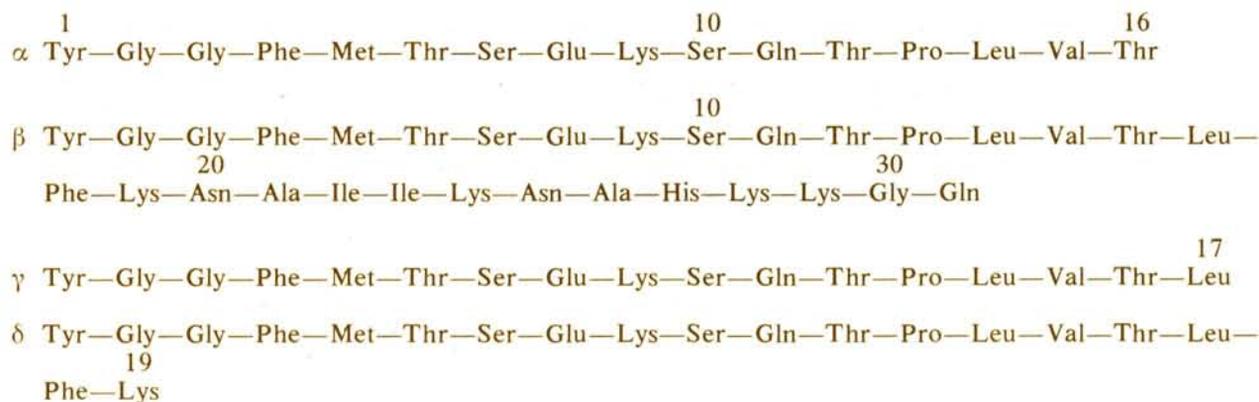
Энкефалины и эндорфины. Энкефалины и эндорфины — представители так называемых опиоидных пептидов, т. е. пептидов, действующих на морфиновые (опиатные) рецепторы головного мозга. Интерес к их изучению связан со способностью этих соединений, аналогично морфину, подавлять боль и вызывать состояние эйфории.

Систематические исследования морфина и его синтетических аналогов привели в 1973 г. к открытию опиатных рецепторов (С. Снайдер, Э. Саймон, Л. Терениус и др.) (позднее были идентифицированы их разные типы — μ , δ , κ). Поиск эндогенных лигандов к рецепторам привел к обнаружению и установлению строения двух энкефалинов, выделенных первоначально из мозга свиньи (Д. Хьюз, 1975), — *Met-энкефалина* и *Leu-энкефалина*.

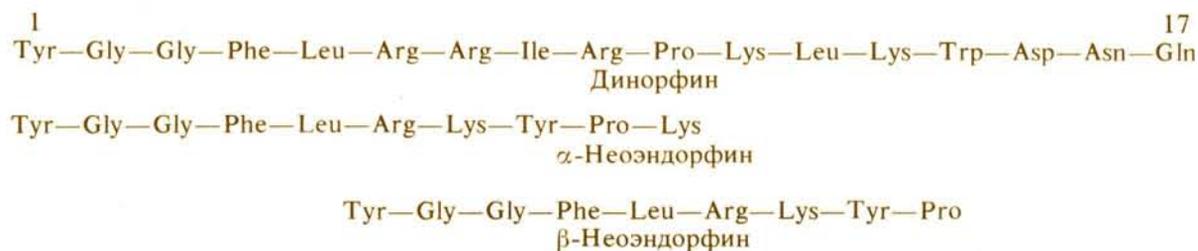
Тыр—Gly—Gly—Phe—Met
Тыр—Gly—Gly—Phe—Leu

Met-энкефалин
Leu-энкефалин

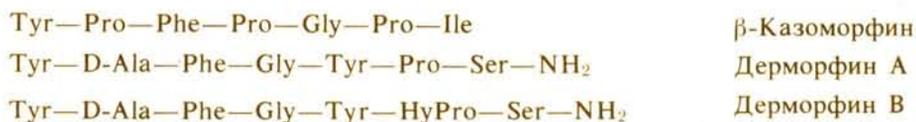
Вскоре были выделены и охарактеризованы другие пептиды этой группы — α -, β -, γ - и δ -эндорфины (эндогенные морфины) (Ч. Ли, Р. Гиллемин, 1975 — 1976):



Несколько позже удалось идентифицировать еще ряд опиоидных пептидов, а именно динорфин (1 — 17) из гипофиза свиньи (А. Гольдштейн, 1979) и α - и β -неоэндорфины (Г. Матсуо, 1980):



Пептиды с ярковыраженной опиоидной активностью выделены и из других источников: β -казоморфин (из гидролизатов казеина) и дерморфины А и В (из кожи южноамериканской лягушки):



Биологическое действие опиоидных пептидов связано с регуляцией болевых ощущений (анальгезия), эмоционального поведения, памяти, обучаемости. Подобно своим растительным аналогам,

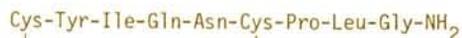
эти пептиды способны вызывать и явления, характерные для наркотиков,— привыкание, физическую зависимость, угнетение дыхания и сердечной деятельности. Не исключено, что механизм действия опиоидов основан на их участии в секреции ряда нейромедиаторов мозга — дофамина, ацетилхолина, норадреналина и т. п. Все биологические эффекты опиоидов подавляются одним антагонистом — налоксоном.

Синтезировано несколько сотен аналогов опиоидных пептидов, в частности энкефалина и динарфина, многие из которых обладают высокой активностью, пролонгированным действием и находят практическое применение. Относительно характера взаимодействия этих соединений с их рецепторами можно лишь утверждать — большинство нейропептидов данной группы имеют весьма подвижные конформации в растворах и их взаимодействие с рецептором лучше объясняется на основе концепции «динамического фармакофора» (взаимного индуцированного соответствия лиганда и рецептора).

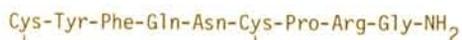
Окситоцин и вазопрессин — первые биологически активные пептиды, выделенные из нервной ткани (Дж. Абель, 1924). Структура этих нейрогормонов была подтверждена химическим синтезом (В. Дю Виньо, 1953) — впервые осуществленным полным синтезом природных пептидов (см. с. 126).



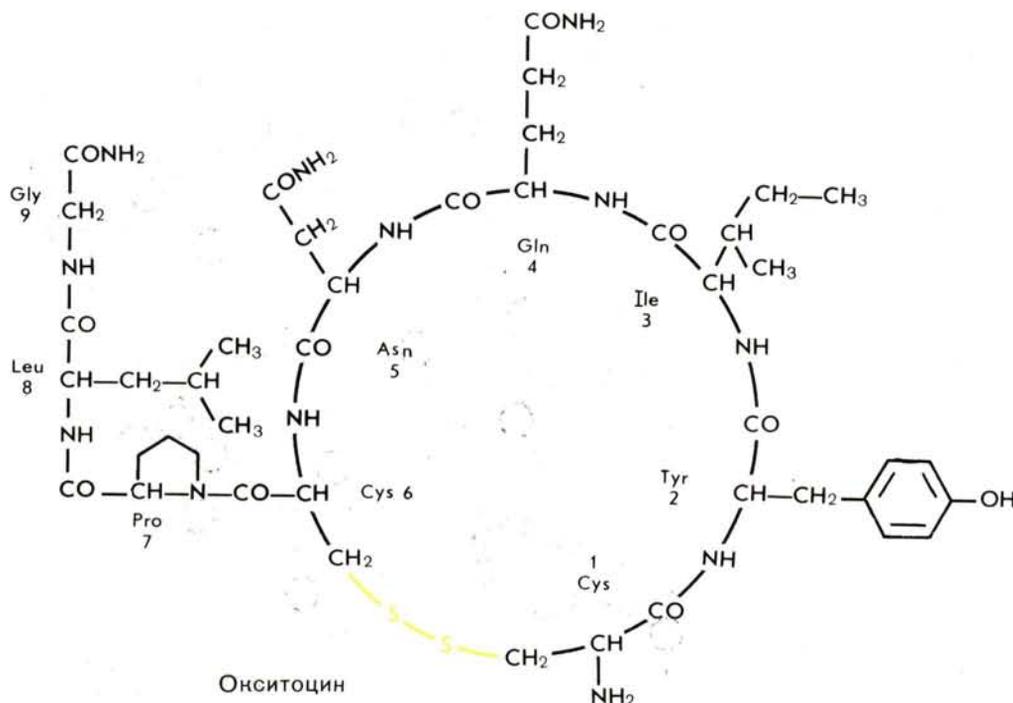
Дю Виньо [Du Vigneaud] Винсент (1901—1978), американский биохимик. Образование получил в Иллинойском университете в Нормале и Рочестерском университете, с 1938 г.— профессор медицинского колледжа Корнеллского университета. Основные работы — по изучению обмена аминокислот, химического строения витаминов и гормонов. Открыл витамин H, назвал его биотином и определил структуру. Выделил, расшифровал структуру и синтезировал гормоны окситоцин и вазопрессин. Лауреат Нобелевской премии по химии (1955).



Окситоцин



Вазопрессин





Швицер [Schwyzer] Роберт (р. 1920), швейцарский химик-биоорганик. Окончил Цюрихский университет; с 1963 г. — профессор Высшей технической школы в Цюрихе, основатель Института молекулярной биологии и биофизики ВТШ. Основные работы посвящены синтезу биологически активных полипептидов, изучению их конформации в растворе, выделению и изучению рецепторов гормонов. Осуществил (1963, совместно с П. Зибером) полный синтез АКГГ.

Конформация окситоцина в растворе установлена на основании данных ЯМР-спектроскопии (Р. Уолтер, Д. Урри) и отличается достаточной жесткостью (прежде всего за счет внутримолекулярной S—S-связи); в такой конформации легко прослеживается элемент β -структуры (рис. 155).

Окситоцин и вазопрессин отличаются весьма широким спектром биологического действия. Они влияют на сокращение гладкой мускулатуры: так, окситоцин вызывает сокращение гладких мышц матки (греческие слова $\delta\epsilon\upsilon\sigma$ + $\tau\omicron\chi\omicron\sigma$ означают «быстрые роды»), а вазопрессин сокращает периферические артериолы и капилляры и тем самым обуславливает повышение давления крови. Кроме того, окситоцин стимулирует лактацию, а вазопрессин оказывает заметное действие на водный обмен (является антидиуретическим гормоном) и способствует также распаду гликогена в печени. Оба гормона, а также их многочисленные аналоги широко используются в медицинской и сельскохозяйственной практике и производятся на основе химического синтеза в промышленных масштабах.

Оба гормона синтезируются в гипоталамусе и с помощью специальных белков-переносчиков (нейрофизин I и II) поступают в нейрогипофиз.

Секреция вазопрессина и окситоцина происходит в ответ на возбуждение соответствующих нейронов. Поскольку вазопрессин регулирует в основном водный баланс в организме, то стимулами его секреции служат изменение осмотического давления крови, изменение артериального давления, аноксия. Нервные импульсы передают информацию об этих изменениях в головной мозг, и возбуждение соответствующих нейросекреторных клеток приводит к освобождению вазопрессина. Стимулами секреции окситоцина служат, в частности, нервные импульсы, возникающие в результате раздражения сосков при кормлении молоком.

Вазопрессин активирует в тканях — мишенях аденилатциклазу, и его «вторым мессенджером» служит сАМР. Таким посредником у окситоцина, вероятно, является Ca^{2+} . В печени вазопрессин функционирует также через инозиттрифосфатный механизм.

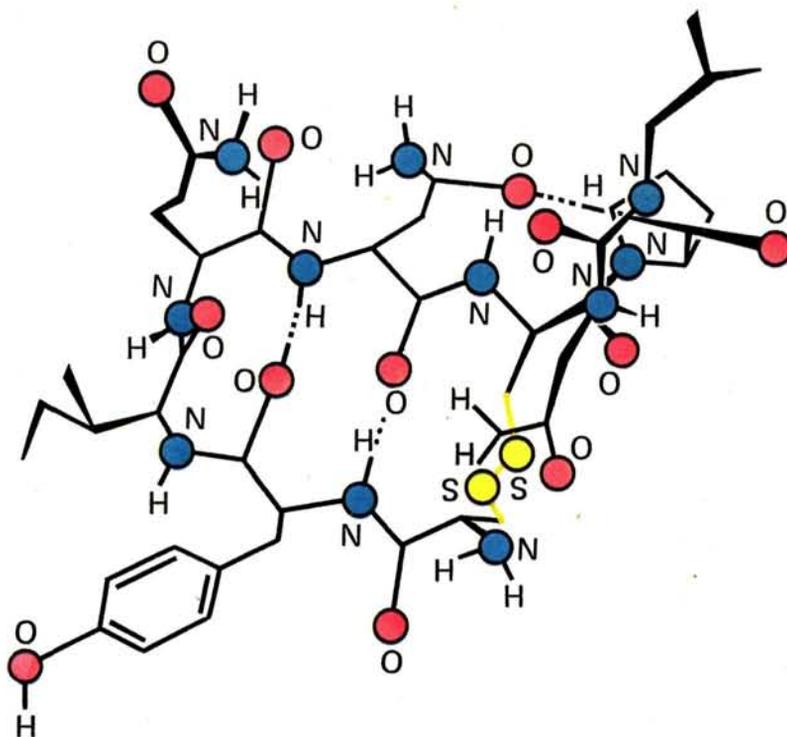


Рис. 155. Конформация молекулы окситоцина в растворе.

Имеются данные об участии вазопрессина в механизмах памяти, в частности вазопрессин стимулирует долговременную память. У животных с генетическими нарушениями в синтезе вазопрессина обнаруживается дефицит обучаемости.

Адренокортикотропный гормон. Адренокортикотропный гормон (АКТГ, кортикотропин) — 39-членный полипептид, вырабатываемый клетками передней доли гипофиза. На рисунке 156 представлены структуры АКТГ ряда животных и человека. Полный синтез 39-членного пептида со структурой, первоначально предложенной для АКТГ свиньи, был осуществлен в 1963 г. Р. Швицером и П. Зибером. Полученное соединение было близко по своим свойствам природному гормону, однако позднее структура последнего была уточнена. Синтез АКТГ человека был проведен независимо группами К. Хофманна и Р. Швицера.

Адренокортикотропный гормон обладает широким спектром биологического действия. Основным из вызываемых им эффектов заключается в стимуляции коры надпочечников, продуцирующей гормоны адаптации — кортикостероиды. Кроме того, АКТГ проявляет липотропную активность, стимулирует синтез жирных кислот в жировых клетках, снижает содержание глюкозы в крови, влияет на белковый обмен, нервную систему и поведение животных.

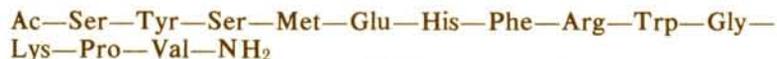
Хотя пространственное строение АКТГ окончательно не установлено, анализ биологического действия большого числа синтетических аналогов и природных вариантов гормона позволяет сделать важные выводы о закономерностях связи его структуры и функции. В частности, установлено, что фрагмент (1 — 24) обладает практически полной активностью АКТГ, он выпускается в промышленных масштабах под названием «Синактен» (фирма СІВА, Швейцария). Участок (25 — 33), где локализованы структурные различия, служит своего рода «антигенной детерминантой» при определении видовой специфичности и несуществен для проявления гормональной активности. Наконец, участки (11 — 20) и (4 — 10) важны для связывания с рецептором и генерации биологического импульса соответственно. Фрагмент АКТГ (4 — 10), получивший название «актона», входит в структуру ряда других гормонов гипофиза. Еще более короткий фрагмент (4 — 7) влияет на формирование рефлексов обучаемости у крыс.

Значительная часть работ по синтезу и исследованию взаимосвязи между структурой и функцией в ряду аналогов и фрагментов АКТГ выполнена венгерскими химиками К. Медзиградским, Л. Кишфалуди, С. Байюшем и сотрудниками.

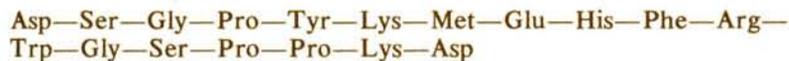
Меланоцитстимулирующие гормоны (МСГ, или меланотропины) выделяются из промежуточной доли гипофиза. Эти соединения способны стимулировать пигментные клетки (меланоциты), что приводит к усилению биосинтеза пигмента меланина и потемнению кожи (в опытах на земноводных).



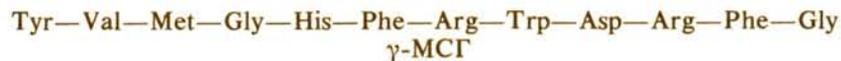
Хофманн [Hofmann] Клаус (р. 1911), американский химик-биоорганик. Окончил Высшую техническую школу в Цюрихе; с 1938 г. работает в США, с 1964 г. — профессор Питтсбургского университета. Основные работы посвящены химии стероидных и пептидных гормонов, терпенов, витаминов, ферментов. Открыл лактобацилловую кислоту, осуществил синтез меланоцитстимулирующего гормона, полный синтез АКТГ, провел первый частичный синтез рибонуклеазы А.



α -МСГ

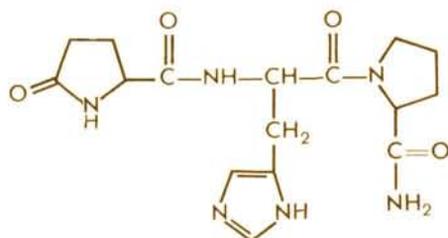


β -МСГ



γ -МСГ

Тиреолиберин (TRF) — один из самых маленьких природных пептидов: в нем всего три аминокислотных остатка. Его строение было установлено Р. Гиллемином с помощью синтетических методов; особенностью структуры является наличие остатка пироглутаминовой кислоты (>Glu).



Тиреолиберин
(>Glu-His-Pro-NH₂-)

Этот гормон стимулирует секрецию тиреотропина и пролактина, вероятно, путем активации аденилатциклазы.

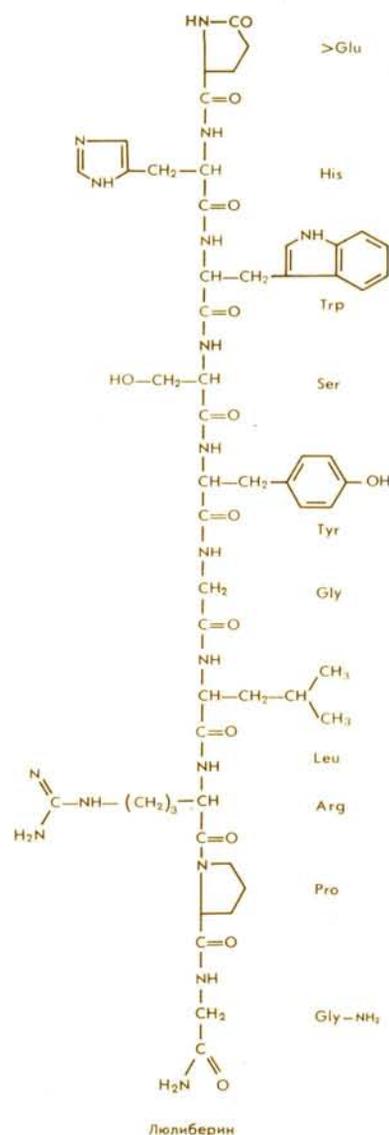
Аналогичной активностью обладает **люлиберин** (гонадолиберин), стимулирующий секрецию аденогипофизом лютеинизирующего гормона, или лютропина. Его структура была установлена в 1971 г. (Э. Шелли) и подтверждена полным синтезом (Р. Гиллемин).

Интересно, что ряд аналогов люлиберина, например [D-Trp⁶]-люлиберин и дез-Gly¹⁰-[D-Trp⁶, Pro⁹-NEt]-люлиберин, обладают в десятки раз более высокой активностью, чем природный гормон. Это связано, вероятно, с повышенной устойчивостью этих соединений к инактивации тканевыми ферментами. Аналоги люлиберина с пролонгированным действием успешно применяются при лечении некоторых форм бесплодия у женщин и в качестве контрацептивных средств. Весьма перспективно использование люлиберина в животноводстве для синхронизации эстрального цикла и других целей.

В 1973 г. Р. Гиллемином была определена структура гипоталамического фактора, ингибирующего синтез гормона роста (соматотропина), — этот фактор был назван соматостатином. Как и окситоцин, соматостатин представляет собой циклический дисульфид, его структура подтверждена полным синтезом (1974). Биологическую активность проявляют как восстановленная, так и окисленная формы гормона, в то же время аналоги соматостатина, неспособные образовывать дисульфидную связь, полностью неактивны.

Соматостатин ингибирует секрецию не только соматотропина, но и тиротропина, инсулина, глюкагона, гастрина и секретина. Соматостатин, влияющий на секрецию гормонов поджелудочной железы, не переносится в этот орган из гипоталамуса, а образуется непосредственно в других органах и тканях организма: в поджелудочной железе, в спинном мозге, в секреторных клетках вдоль всего желудочно-кишечного тракта.

Соматостатин — перспективное средство для лечения акромегалии (гигантизма), связанной с избыточным образованием соматотропина в гипофизе, а также некоторых форм диабета. Широкий



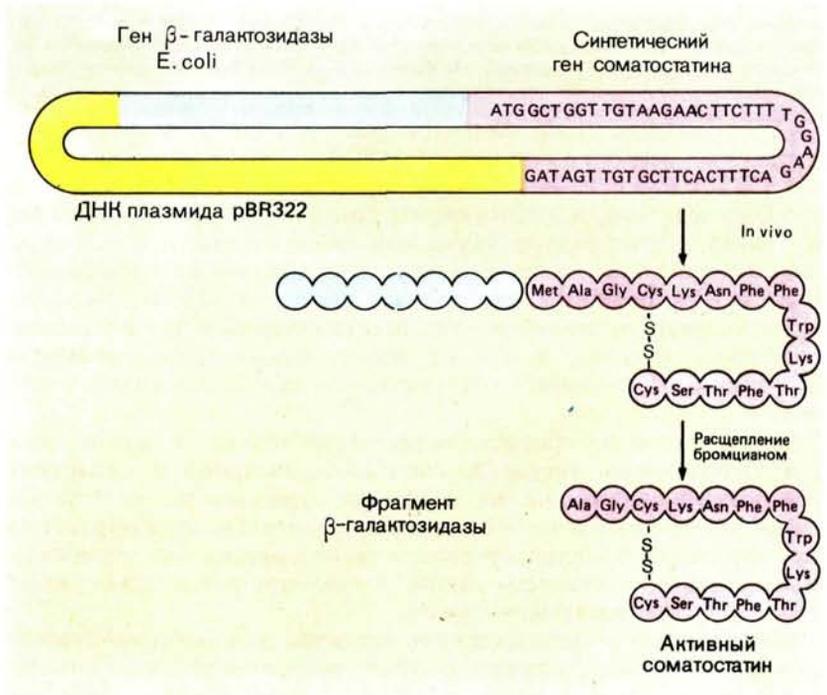
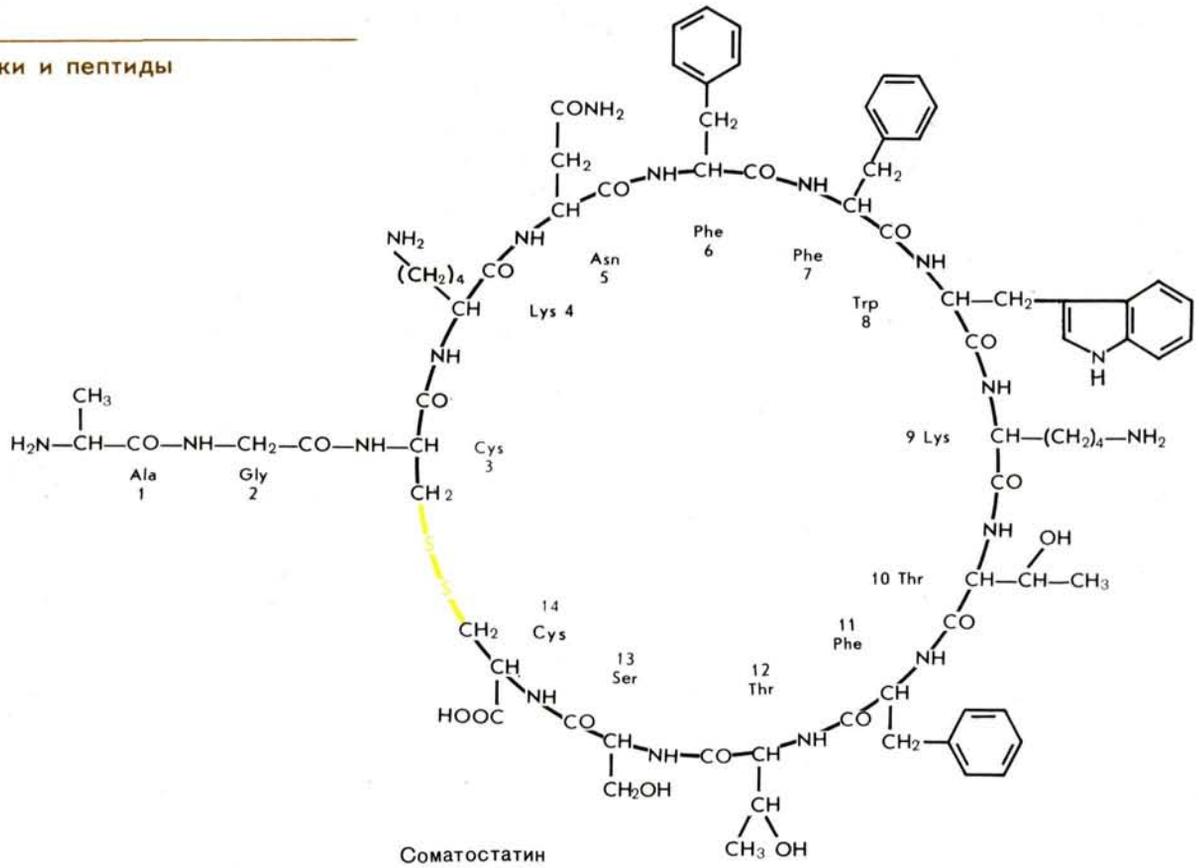


Рис. 157. Синтез соматостатина в бактериальной системе.

спектр и кратковременность действия соматостатина пока препятствуют его использованию в медицине. Усилия ученых-синтетиков направлены на получение аналогов гормона, обладающих большей специфичностью действия.

Соматостатин был первым гормоном животных, биосинтез которого был осуществлен методом геной инженерии. В 1977 г. К. Итакура и Г. У. Бойер с сотр. синтезировали ген соматостатина и встроили его в плазмиду. Клетки *E. coli* были трансформированы с помощью этой мизерной плазмидной ДНК, и в них синтезировался полипептид, включающий последовательность аминокислот, соответствующую соматостатину (рис. 157) (см. с. 437).

В настоящее время известны и другие пептиды класса либеринов и статинов. Помимо их основной, тропной активности, они действуют также на кору больших полушарий, мозжечок, влияют на поведение и двигательную активность и перспективны при лечении нервно-психических расстройств.

Вещество Р. Открыто в 1931 г. в связи с его способностью стимулировать сокращения гладкой мускулатуры, расширение сосудов и слюноотделение. Строение установлено в 1971 г.:

Arg—Pro—Lys—Pro—Gln—Gln—Phe—Phe—Gly—Leu—Met.

Вещество Р содержится в большом количестве в гипоталамусе, субстанции nigra и других отделах мозга; обнаружено также в спинном мозге. Оно регулирует двигательную активность и болевые ощущения, влияет на эмоции и поведение (например, подавляет агрессию). Широкий спектр фармакологической активности вещества Р связывают с его нейромодуляторными и нейромедиаторными функциями. Некоторые вопросы регуляторного действия вещества Р исследованы П. Оме с сотр. Среди синтетических аналогов вещества Р, находящихся практическое применение, наиболее известны препараты с сильным антистрессорным действием.

Пептиды-коннекторы. Одним из первых пептидов этой группы стал скотофобин, выделенный в США Г. Унгаром. В ходе экспериментов было установлено, что если крысу приучить избегать темноты, то в ответ на этот привитый рефлекс в мозге животного синтезируется скотофобин; при введении этого пептида контрольным животным рефлекс полностью воспроизводится. Строение скотофобина установлено в 1972 г. на основании масс-спектрометрического метода и химического синтеза:

Ser—Asp—Asn—Asn—Gln—Gln—Gly—Lys—Ser—Ala—Gln—Gln—Gly—Gly—Tyr—NH₂

Впоследствии были выделены и другие аналогичные пептиды из мозга белых крыс и золотых рыбок (амелитин, хромодиопсины, катабатмофобин и др.). В отношении биологической активности этих соединений, названных пептидами-коннекторами, пока существуют противоречивые данные.

Пептиды, действующие на сон. Большое внимание уделяется изучению нейропептидов, влияющих на сон, так как проблемы понимания природы сна и выяснения механизмов его регуляции постоянно находятся в поле зрения нейрофизиологов и медиков. Первые опыты, указывающие на существование гуморальных факторов сна, относятся к 1910 г. В 1977 г. швейцарские ученые М. Моннье и Г. Шененбергер установили строение пептида, названного ими DSIP (δ -sleep inducing peptide), который был выделен из церебральной венозной крови кроликов, подвергнутых электроча-



Иванов Вадим Тихонович (р. 1937), советский химик-биоорганик, академик АН СССР (1987). Окончил Московский университет (1960), с 1963 г.— в Институте биоорганической химии им. М. М. Шемякина АН СССР. Основные работы — в области химии физиологически активных соединений белково-пептидной природы. Совместно с Ю. А. Овчинниковым установил конформационные особенности и механизм действия ионофоров валиномицина и эзниатинов (1969). Предложил комплексный подход к изучению пространственной структуры пептидов в растворах, определил пространственное строение грамицидина S, брадикинина и др. Лауреат Ленинской (1978) и Государственной (1985) премий СССР.

тых структур, находящихся в равновесии, причем первые, вероятно, ответственны за реализацию биологического действия. Так, циклический аналог нейропептида — цикло(—Gly—DSIP—) обладает значительной гипногенной и антистрессорной активностью.

Липотропины. В 1964—1967 гг. американский биохимик Чо Хао Ли выделил из гипофиза группу гормонов, стимулирующих липолиз в жировой ткани; они были названы α -, β - и γ -липотропинами. Эти гормоны являются белками, а не пептидами, но их рассмотрение в данной главе оправдано в связи с их ролью в биосинтезе нейропептидов. В частности, было установлено, что β -липотропин, содержащий 91 аминокислотный остаток, подвергается в мозге ферментативному расщеплению (процессингу) по пептидной связи между остатками 59 и 60 с образованием α -липотропина и β -эндорфина.

В настоящее время можно считать доказанным, что большая группа нейропептидов мозга синтезируется из более крупного предшественника, в состав которого входит также АКТГ. Из клеток опухоли гипофиза мыши удалось выделить гликозилированный белок с молекулярной массой около 30 000, который, по данным иммунохимического анализа, содержал антигенные детерминанты β -эндорфина, β -липотропина, АКТГ. В 1979 г. группа японских и американских авторов (Ш. Нума и др.) опубликовала полную аминокислотную последовательность биосинтетического предшественника нейропептидов, выведенную на основании анализа нуклеотидной последовательности соответствующего гена. Этот белок-предшественник был назван *препроопиомеланокортином*. Как следует из его структуры (рис. 158), ген кодирует всю последовательность белка, включая сигнальный пептид, γ -, β - и α -МСГ, АКТГ, α - и β -липотропин и β -эндорфин. При процессинге расщепление происходит почти исключительно по остаткам основных аминокислот (Lys, Arg) и осуществляется трипсиноподобными ферментами группы катепсина В или катепсина D.

Пока нет достоверного объяснения, почему природа предпочитает синтезировать несколько различных нейропептидов в виде общего предшественника. В то же время известно, что процессинг этого белка в разных клетках протекает по-разному. Помимо проопиомеланокортина, являющегося предшественником β -эндорфина, АКТГ и меланотропинов, существуют еще 2 независимых белка-предшественника опиоидных пептидов — проэнкефалин для Met- и Leu-энкефалинов и продинорфин — для α -неоэндорфина, динорфина (1 — 17), динорфина (1 — 8) и β -эндорфина.

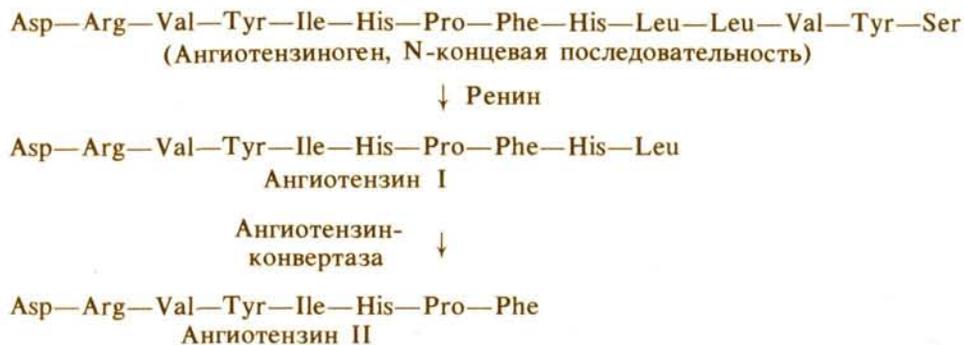
Пептидные гормоны

Наряду с нейропептидами, к числу которых относятся многие гормоны гипофиза и гипоталамуса, в животном организме функционирует большое число пептидных гормонов, выполняющих самые разнообразные биологические функции. Эти соединения, по существу, аналогичны уже рассмотренным белковым гормонам, и их отличает лишь формальная принадлежность к классу пептидов.

Тканевые гормоны образуются из неактивных предшественников в плазме крови и оказывают регулирующее действие на кровяное давление и сокращение гладкой мускулатуры; иногда их называют *кининовыми гормонами*. К ним относятся ангиотензин, каллидин и брадикинин.

А н г и о т е н з и н. В конце XIX в. было установлено, что почки участвуют в регуляции артериального кровяного давления, и вскоре из коры почек было выделено вещество, названное *ренином*, которое при внутривенном введении кроликам вызывало повышение давления крови. Характерно, что клетки почек выделяют в кровь ренин в ответ на понижение кровяного давления, уменьшение эффективного объема крови, снижение концентрации Na^+ в крови и т. п., определение содержания ренина в крови используется в диагностике инфаркта миокарда и других заболеваний.

Механизм действия ренина, представляющего собой термостабильную пептидазу, связан с расщеплением сывороточного α_2 -глобулина, или ангиотензиногена, с образованием декапептида ангиотензина I; последний при участии ангиотензин-конвертирующего фермента отщепляет С-концевой дипептид и превращается в ангиотензин II, обладающий ярковыраженным прессорным действием:



Ангиотензин II действует на гладкие мышцы кровеносных сосудов; кроме того, он стимулирует секрецию клетками коры надпочечников стероидного гормона альдостерона, влияющего на солевой обмен в организме. Синтетические аналоги ангиотензина используются в медицинской практике.

К а л л и д и н и б р а д и к и н и н, в отличие от ангиотензина, снижают кровяное давление. Брадикинин впервые был обнаружен после инкубации плазмы крови со змеиным ядом или трипсином, а каллидин был найден в сыворотке после инкубации ее с калликреином — сериновой протеиназой из мочи. Схема образования каллидина и брадикинина представлена на рисунке 159.

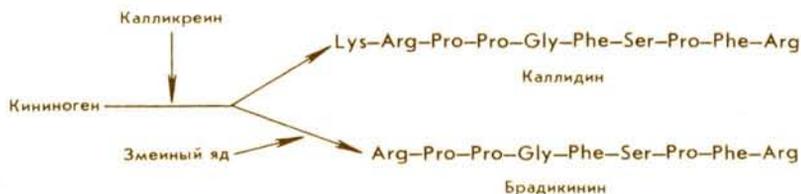
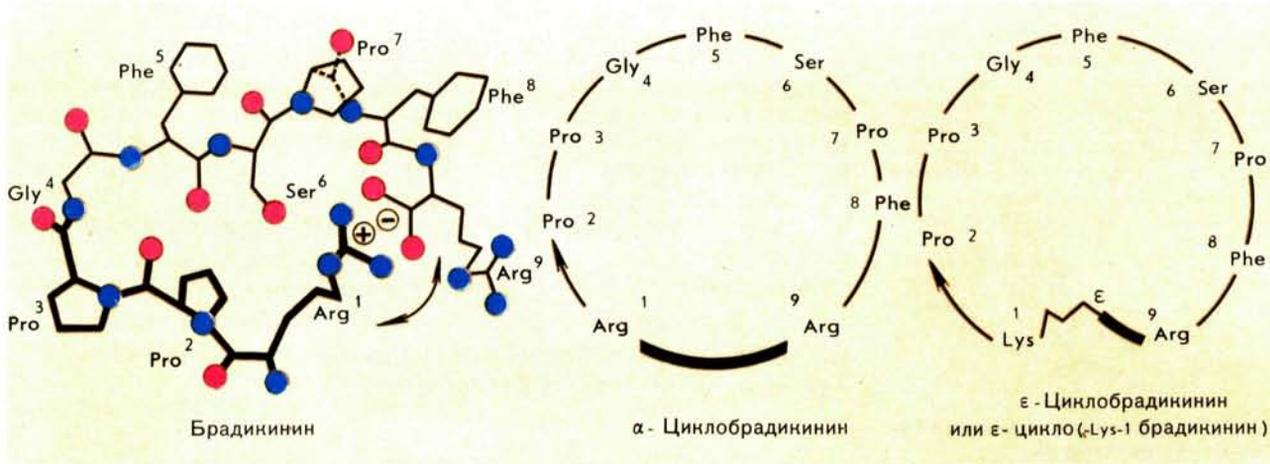


Рис. 159. Схема образования кининов.

Каллидин и брадикинин обладают во многом сходным действием. Они увеличивают проницаемость капилляров, проявляют мощный гипотензивный эффект. В низких концентрациях брадикинин стимулирует сокращение гладкой мускулатуры кишечника, а в более высоких — сокращение мышц матки. При введении в организм брадикинин вызывает сильные болевые ощущения.

Пространственное строение брадикинина исследовалось с помощью комплекса физико-химических и теоретических методов. Согласно этим данным (В. Т. Иванов и Г. И. Чипенс) для брадикинина возможно образование свернутых структур, стабилизированных ионными взаимодействиями С-концевого карбоксила и гуанидиновой группы N-концевого аргинина. Вероятность таких взаимодействий повышается при переходе к органическим растворителям и в комплексе с рецептором. Действительно, циклические аналоги брадикинина обладают высокой биологической активностью.



В 1979 г. все компоненты ренин-ангиотензивной системы были обнаружены и в мозге. Можно считать установленным, что ангиотензин и брадикинин участвуют в функционировании центральной нервной системы. Брадикинин является одним из медиаторов боли, а ангиотензин II вызывает ощущение жажды.

Кальцитонин. Гормон, снижающий концентрацию Ca^{2+} в крови, был открыт в 1964 г. Он синтезируется в парафолликулярных клетках щитовидной железы, вероятно, в форме прогормона. Эти секреторные клетки резко отличаются по своей морфологии от фолликулярных клеток, где синтезируются иодсодержащие гормоны щитовидной железы.

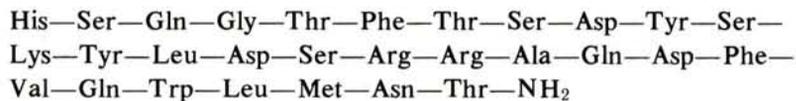
В настоящее время известна первичная структура кальцитонинов нескольких видов животных (рис. 160). Хотя в состав кальцитонина входит всего 32 аминокислотных остатка, расшифровка его первичной структуры была сопряжена с определенными трудностями.

Основная функция кальцитонина состоит в регуляции кальциевого обмена. Он стимулирует аденилатциклазу в костных клетках.

1	Cys			
2	Ser			Gly
3	Asn			
4	Leu			
5	Ser			
6	Thr			
7	Cys			
8	Val	Met	Met	
9	Leu			
10	Ser	Gly	Gly	
11	Ala	Lys	Thr	
12	Tyr	Leu		
13	Trp	Ser	Thr	
14	Arg	Lys	Gln	
15	Asp	Asp	Asp	
16	Leu		Phe	
17	Asn	His		
18	Asn	Lys	Lys	
19	Phe	Tyr	Leu	
20	His		Gln	
21	Arg		Thr	Thr
22	Phe	Tyr		
23	Ser		Pro	Pro
24	Gly		Arg	Gln
25	Met		Thr	Thr
26	Gly		Asn	Ala
27	Phe		Thr	Ile
28	Gly			
29	Pro	Ala	Val	
30	Glu	Gly	Gly	
31	Thr	Val	Ala	
32	Pro			
	1	2	3	4

Рис. 160. Аминокислотная последовательность кальцитонинов: 1) свиньи; 2) овцы; 3) лосося; 4) человека.

Глюкагон. В поджелудочной железе, помимо инсулина, вырабатывается другой гормон, влияющий на обмен углеводов — глюкагон. Этот 29-членный пептид вызывает повышение уровня глюкозы в крови за счет стимуляции расщепления гликогена в печени, увеличивает содержание глюкозо-6-фосфата в мышцах и обладает липолитическим действием.

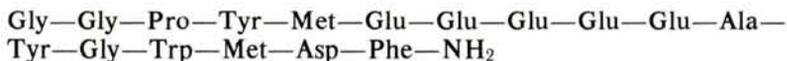


Полный синтез глюкагона осуществлен в 1968 г. (Э. Вюнш и сотр.). По данным рентгеноструктурного анализа (Т. Бландел), молекула глюкагона преимущественно находится в α -спиральной конформации и склонна к образованию олигомеров.

Гормоны желудочно-кишечного тракта. В регуляции процессов пищеварения важную роль играет многочисленная группа пептидных гормонов — гастрин, холецистокинин-панкреозимин, секретин и др.

Гастрин был открыт в 1905 г. в слизистой желудка свиньи. Как установлено в настоящее время, он секретируется клетками многих отделов желудочно-кишечного тракта и его секреция стимулируется приемом пищи. Главное биологическое действие гастрин связано с секрецией желудком соляной кислоты; кроме того, он влияет на сократимость желудка, ингибирует адсорбцию воды и электролитов подвздошной кишкой, стимулирует выделение ферментов.

Структура гастрин I выяснена в 1964 г.:



Гастрин II, в отличие от гастрин I, имеет сульфатированный остаток Tyr¹². С-Концевой пептид гастрин I



обладает практически полным биологическим действием гормона. Этот аналог, а также синтетический пептид



выпускаются на основе химического синтеза в промышленных масштабах и широко применяются в практике.

Первый полный синтез гастрин осуществлен в 1966 г. (Г. Кеннер и сотр.). В плазме крови обнаружен предшественник гастрин, получивший название «большого гастрин» (мол. масса 7 000).

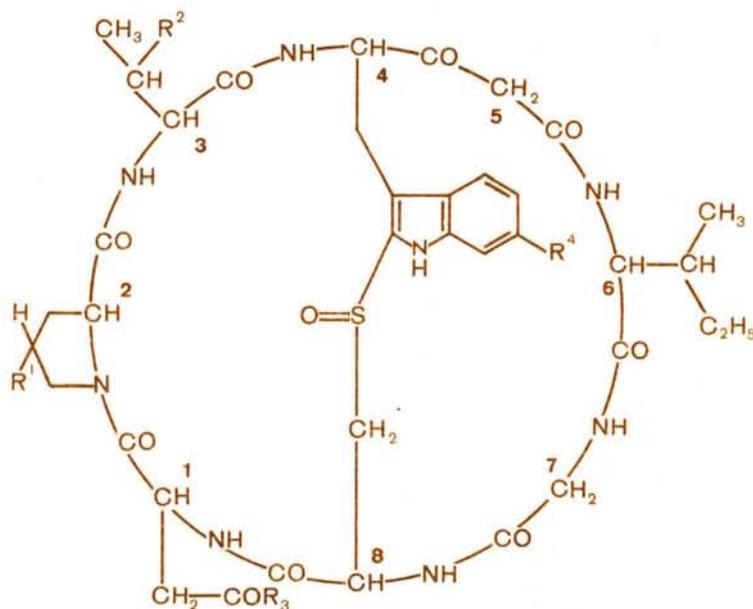
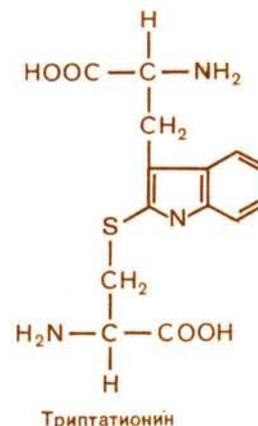
Холецистокинин-панкреозимин (ХЦК-ПЗ) имеет двойное название, поскольку два основных вызываемых им физиологических эффекта — сокращение желчного пузыря и стимуляция секреции пищеварительных ферментов поджелудочной железой — первоначально приписывались двум разным гормонам. Лишь в 1964 г. был выделен 33-членный пептид, обладающий этими двумя видами физиологической активности. Интересно отметить,

Как легко видеть, микотоксины являются циклопептидами необычной структуры. Фаллоидин и α -аманитин представляют собой бициклические системы, в которых «мостик» образован бифункциональной аминокислотой — триплатионином (продукт окислительной конденсации L-Trp и L-Cys).

Кроме того, в состав этих циклопептидов входят L-аллогидроксипролин, L-аланин, D-треонин- γ , δ -дигидрокси-L-лейцин (2-амино-4,5-дигидроксиизогексановая кислота) и другие остатки. Строение фаллоидина было подтверждено его полным синтезом (Т. Виланд, Э. Мунката, 1977). Структурные вариации природных компонентов *Amanita* показаны на примере наиболее токсичных аматоксинов.

Среди грибников случаи смертельного отравления бледной поганкой достаточно часты. Токсины содержатся в грибах в высокой концентрации (аматоксины — 0,4 мг на 1 г массы), и поскольку смертельная доза для человека составляет 5 — 7 мг, то один съеденный гриб может вызвать летальный исход.

Механизм биологического действия аматоксинов связан с ингибированием эукариотической ДНК-зависимой РНК-полимеразы. Фаллоидин необратимо связывается с примембранным актином, вызывая его полимеризацию, что, в свою очередь, приводит к нарушению морфологии мембран гепатоцитов.



Аматоксин	R ¹	R ²	R ³	R ⁴
α - Аманитин	OH	CH(OH)CH ₂ OH	NH ₂	OH
β - Аманитин	OH	CH(OH)CH ₂ OH	OH	OH
γ - Аманитин	OH	CH(OH)CH ₃	NH ₂	OH
ϵ - Аманитин	OH	CH(OH)CH ₃	OH	OH
Аманин	OH	CH(OH)CH ₂ OH	OH	H
Амануллин	OH	C ₂ H ₅	NH ₂	OH
Проамануллин	H	C ₂ H ₅	NH ₂	OH



Виланд [Wieland] Теодор (р. 1913), немецкий химик. Окончил Мюнхенский университет (1937), в 1968—1981 гг.— профессор Института медицинских исследований Общества М. Планка в Гейдельберге (ФРГ). Известен работами в области химии пептидов. Предложил новые методы пептидного синтеза с использованием смешанных ангидридов и тиоловых эфиров. Установил строение пептидных токсинов из грибов рода *Amanita* — фаллоидина и аманитина, а также соответствующего антитоксина антаманида.

Большая часть последовательности токсина представлена остатками гидрофобных аминокислот, но в С-концевой области расположен кластер положительно заряженных остатков

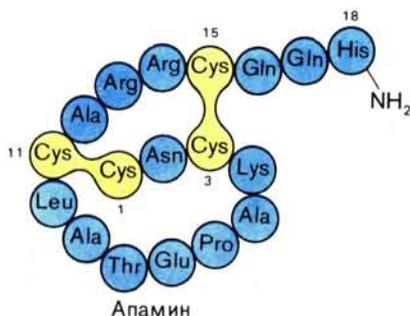
(Lys—Arg—Lys—Arg).

Такое строение обуславливает свойства мелиттина как катионного детергента и его высокую поверхностную активность. Основное биологическое действие мелиттина связано со способностью нарушать структуру мембран. В частности, он вызывает лизис различных клеток и является сильным гемолитиком. Имеются данные о том, что биосинтез мелиттина включает образование соответствующих предшественников (препромелиттина и промелиттина).

Синтез мелиттина и ряда его аналогов был осуществлен Э. Шредером в 1971 г. Характерной особенностью поведения мелиттина в растворе является способность его к агрегации и образованию тетрамеров. Агрегации способствуют высокие концентрации токсина, а также повышение ионной силы и pH раствора. Методом рентгеноструктурного анализа с разрешением 0,28 нм пространственная структура была установлена для кристаллов тетрамерного мелиттина, полученных из водного раствора.

Большое число работ посвящено изучению взаимодействия мелиттина с природными и искусственными мембранами и выяснению конформации токсина, связанного с липидами. Обнаружено, в частности, что мелиттин индуцирует в бислоях ионную проводимость. Характер зависимости этой проводимости от приложенного к мембране потенциала позволил высказать предположение о том, что 4 молекулы мелиттина образуют в мембране потенциал-зависимый канал (Д. Тостесон, 1981). Не исключено, однако, что индуцированная мелиттином проводимость обусловлена не образованием дискретных каналов, а нарушениями структуры липидного бислоя.

Другой токсичный компонент яда пчел *Apis mellifera* — апамин отличается ярковыраженным действием на центральную нервную систему. Первичная структура апамина установлена в 1967 г. Он содержит 18 аминокислот и является одним из самых небольших известных пептидных нейротоксинов.



В ряде лабораторий осуществлены синтезы апамина и его аналогов. С помощью ЯМР-спектроскопии была выяснена конформация апамина в растворе (В. Ф. Быстров). Характерной чертой строения апамина (рис. 161) является наличие α -спирали (остатки 6 — 16) и β -изгиба (остатки 2 — 5).

Апамин действует на периферическую и центральную нервную систему в концентрации 10^{-5} — 10^{-7} М. Установлено, что мишенью

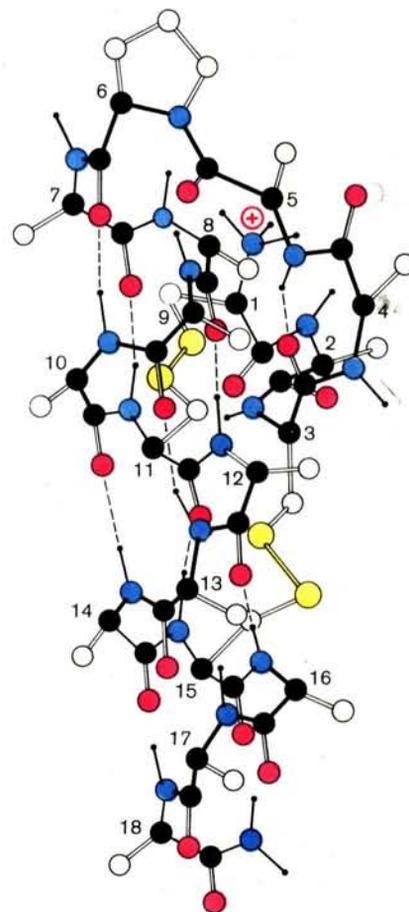


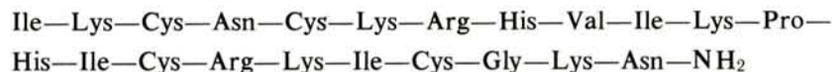
Рис. 161. Конформация молекулы апамина в растворе.



Тостесон [Tosteson] Дэннел С. (р. 1925), американский биофизик. Окончил Гарвардский университет (1949), работает на медицинском факультете того же университета. Основные работы посвящены изучению молекулярных механизмов ионного транспорта через клеточные мембраны.

действия апамина являются Ca^{2+} -зависимые K^{+} -каналы. Апамин специфично и с высоким сродством связывается с соответствующим рецептором ($K_d \approx 2 \cdot 10^{-14} \text{M}$).

MCD-пептид (Must Cell Degranulating peptide) — это соединение, называемое также пептидом 401, содержится в пчелином яде и способно приводить к выделению гистамина из тучных клеток крысы. Структура этого пептида была установлена в конце 60-х годов:



Структурное подобие MCD-пептида и апамина не проявляется в характере биологической активности этих компонентов пчелиного яда: MCD-пептид не действует на центральную нервную систему. Вызываемая им дегрануляция тучных клеток и высвобождение гистамина приводят к воспалительным явлениям.

Нейротоксины из яда змей и скорпионов

Среди пептидных токсинов наиболее хорошо изучены токсические компоненты змеиных ядов, прежде всего нейротоксины постсинаптического действия, блокирующие рецепторы ацетилхолина. Такие нейротоксины присутствуют в яде змей семейства элапидов (кобры, мамбы, крайта), а также многих морских змей.

По своей структуре постсинаптические нейротоксины подразделяются на два класса: «короткие» и «длинные» токсины, состоящие из 60 — 62 или 71 — 74 аминокислотных остатков с 4 или 5 внутримолекулярными дисульфидными связями соответственно

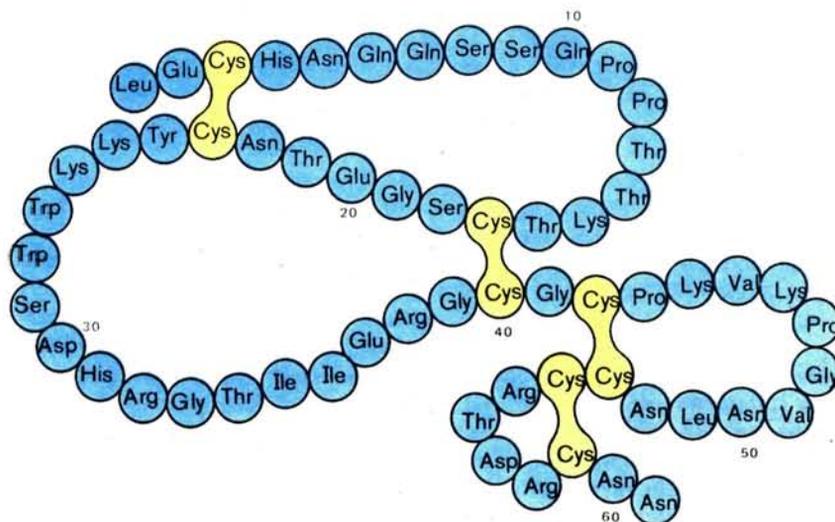


Рис. 162. Структура нейротоксина «короткого» типа из яда кобры *Naja naja oxiana* (Е. В. Гришин, 1974).

Этот токсин, получивший название «кротамин», является единственным нейротоксином яда змей, действующим на натриевые каналы электровозбудимых мембран, подобно растительному нейротоксину вератридину.

В яде скорпионов содержатся нейротоксины, замедляющие скорость инактивации быстрых натриевых каналов. Они представ-

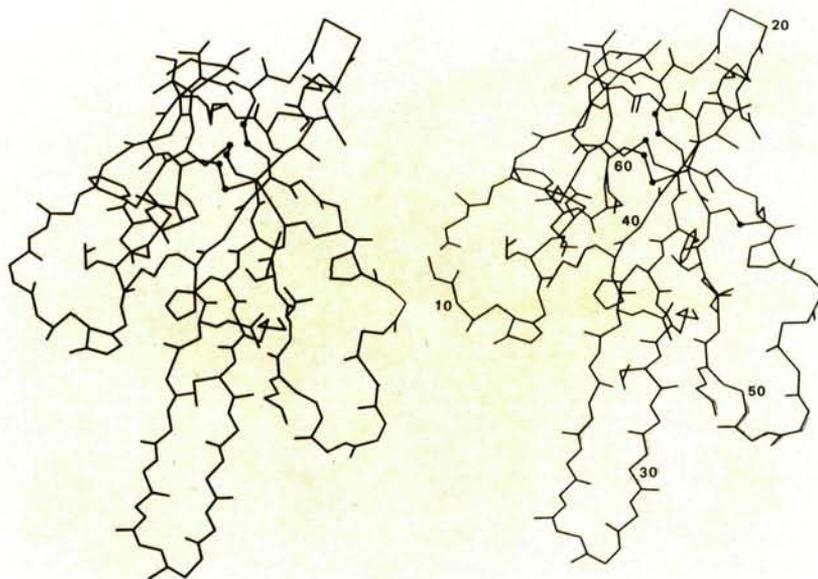


Рис. 164. Стереизображение кристаллической структуры нейротоксина «короткого» типа эрабутоксина b из яда морской змеи *Laticauda semifasciata* (разрешение 0,25 нм).

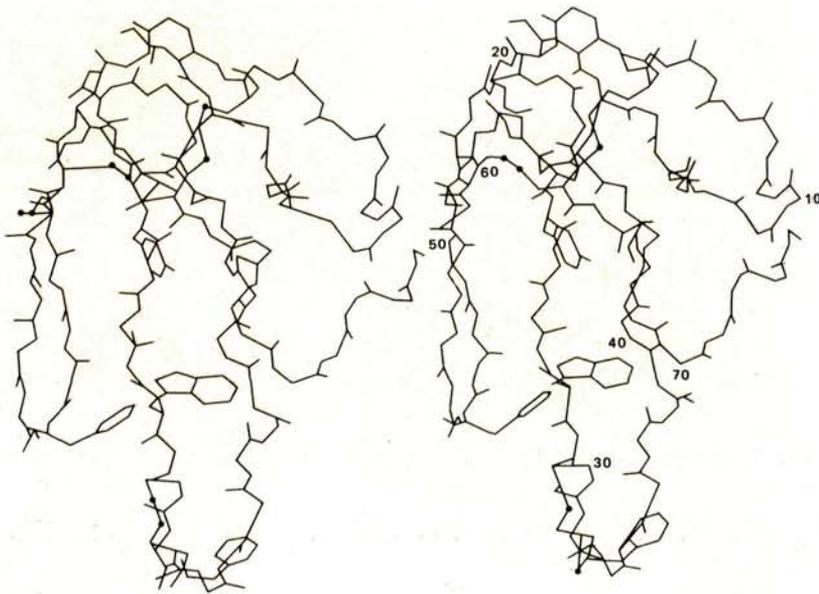


Рис. 165. Стереизображение кристаллической структуры нейротоксина «длинного» типа α -бунгаротоксина из яда крайта *Bungarus multicinctus*.

ляют собой гомологичные полипептиды молекулярной массы 6000 — 8000 с четырьмя внутримолекулярными дисульфидными связями. По своей структуре они довольно сильно отличаются от нейротоксинов яда змей (рис. 166), менее устойчивы, чем нейротоксины яда кобры, и достаточно легко теряют физиологическую активность в разбавленных водных растворах.

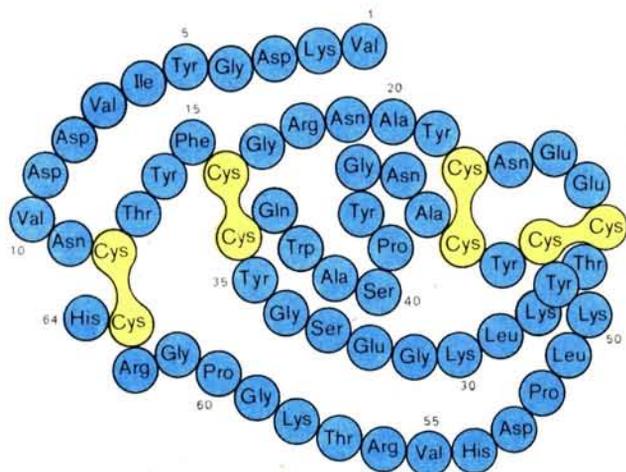
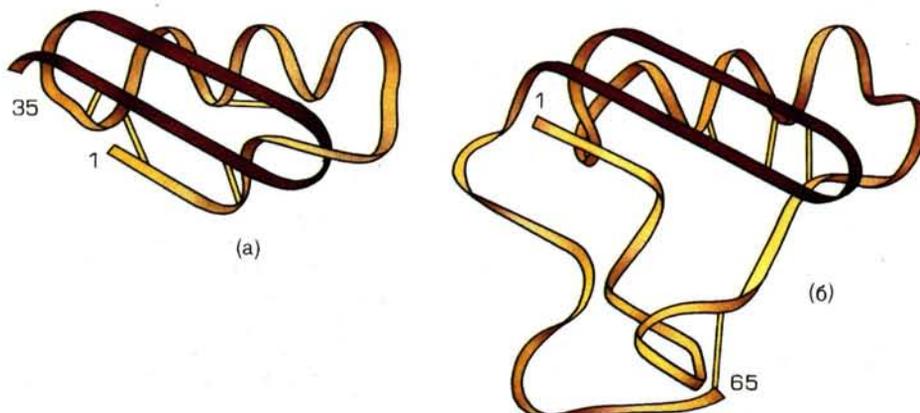


Рис. 166. Структура токсина II из яда скорпиона *Androctonus australis* Hector.

Уникальным свойством яда скорпионов является наличие в его составе токсинов, действующих избирательно только на один из классов животных: млекопитающих, насекомых или ракообразных. Некоторые инсектотоксины скорпионов могут быть построены только из 35 — 36 аминокислотных остатков с четырьмя внутримолекулярными дисульфидными связями. По своей пространственной структуре они напоминают нейротоксины млекопитающих (рис. 167).

Рис. 167. Пространственные структуры нейротоксинов из яда скорпиона *Centruroides sculpturatus* Ewing: (а) — инсектотоксин, (б) — токсин для млекопитающих.



Стрекательные клетки морских анемонов и актиний содержат токсичные полипептиды молекулярной массы около 5000. Подобно нейротоксинам яда скорпиона, они действуют на быстрые натриевые каналы электровозбудимых мембран, влияя на процесс инактивации. Однако по структурным признакам токсины анемонов достаточно сильно отличаются от скорпионовых токсинов. На рисунке 168 представлена структура типичного представителя этой группы гомологичных полипептидов — токсина II, выделенного из средиземноморской анемоны *Anemonia sulcata*. Токсин II состоит из 47 аминокислотных остатков с тремя внутримолекулярными дисульфидными связями и не имеет видимых структурных аналогий ни с токсинами яда змей, ни с токсинами скорпионов. Для этого нейротоксина следует отметить присутствие большого числа гидрофобных аминокислотных остатков.

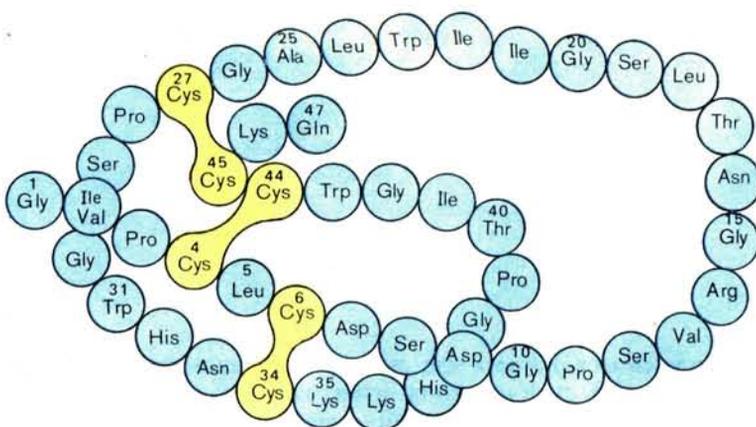
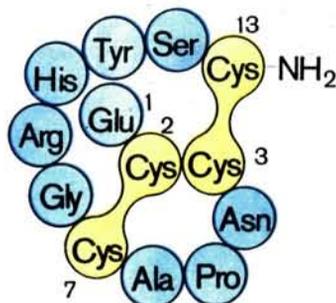


Рис. 168. Структура токсина II из яда средиземноморской анемоны *Anemonia sulcata*.

Наименьшей молекулярной массой обладают нейротоксины из морского моллюска *Conus geographus*. Конотоксины состоят из 13 — 15 аминокислотных остатков с двумя дисульфидными связями. По механизму действия они подобны постсинаптическим нейротоксинам из ядов змей, но почти на порядок превосходят их по токсичности.



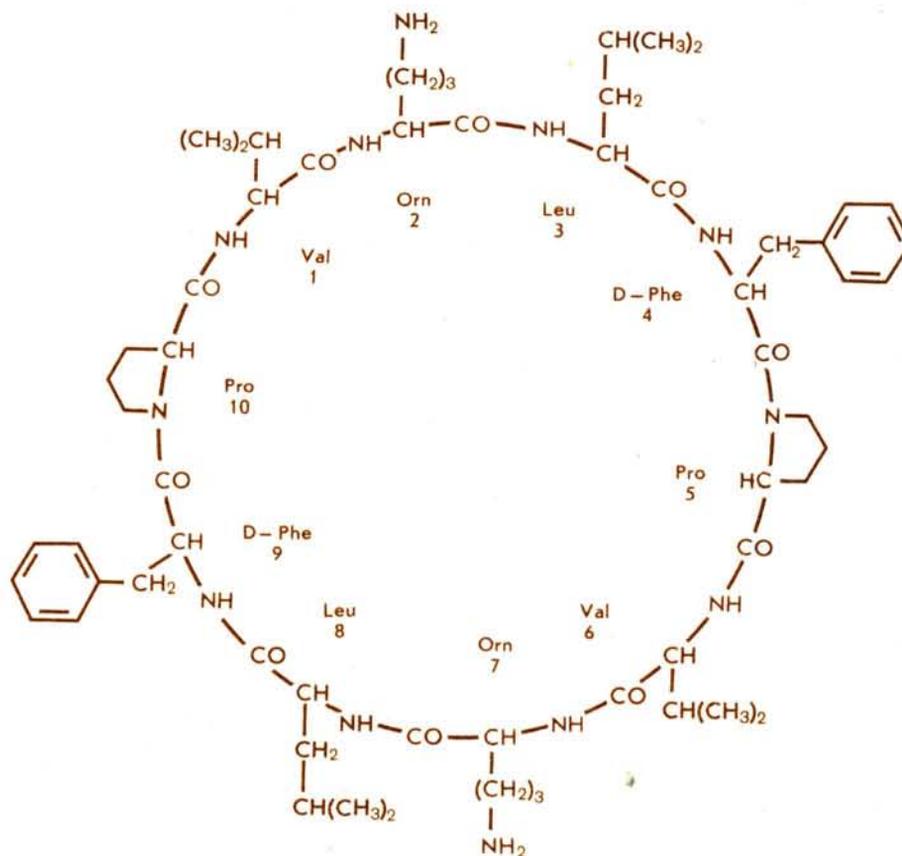
Среди многочисленных антибиотиков пептидной природы заслуживают внимания грамицидин S, тироцидины, полимиксины, бацитрацин, актиномицины и эхиномицины; другие соединения этого типа будут более детально рассмотрены в главе, посвященной биологическим мембранам.

Грамицидин S. Антибиотик впервые выделен из культуральной среды *Bacillus brevis* в 1942 г. Г. Ф. Гаузе и М. Г. Бражниковой («S» означает «советский»), строение его установлено в 1952 г. (Л. Крейг) и доказано в 1956 г. полным химическим синтезом (Р. Швицер).

Пространственное строение грамицидина S выяснено с помощью метода рентгеноструктурного анализа (Д. Ходжкин, 1957) и подтверждено позднее при исследовании конформации антибиотика в растворе (Р. Швицер, Ю. А. Овчинников). Молекула грамицидина S имеет форму β -складчатого листа с четырьмя внутримолекулярными водородными связями, что обеспечивает относительную жесткость циклопептидного скелета и специфическую ориентацию боковых цепей остатков орнитина. Для реализации предпочтительной конформации антибиотика важное значение, несомненно, имеет наличие в нем остатков D-фенилаланина (рис. 169).



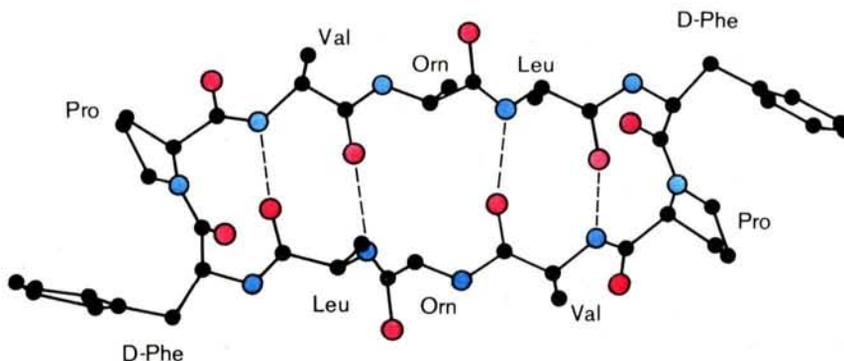
Бражникова Мария Георгиевна (р. 1913), советский химик, работала в Институте по изысканию новых антибиотиков АМН СССР. Занималась получением и изучением новых антибиотиков. За открытие грамицидина S присуждена Государственная премия СССР (1946).



Грамицидин S

Для грамицидина S характерна разносторонняя биологическая активность. Он подавляет грамположительные и слабее грамотрицательные бактерии и применяется в медицинской практике (в частности, для полоскания горла при ангине). Механизм биологического действия антибиотика, по всей вероятности, связан с его взаимодействием с фосфолипидными мембранами, приводящим к их разрушению. Не исключено его участие в трансмембранном транспорте нуклеотидов.

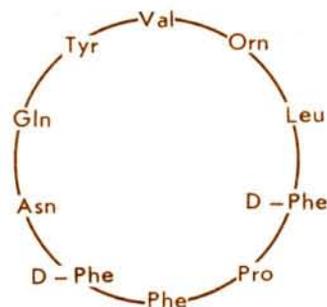
Рис. 169. Структура грамицидина S в кристаллическом комплексе с мочевиной (часть боковых цепей опущена).



Весьма близки грамицидину S по строению и характеру действия антибиотики группы *тироцидина*; показано, что эти соединения образуют комплексы с ДНК, участвуя в регуляции активности генов.



Гаузе Георгий Францевич (1910—1986), советский микробиолог, академик АМН СССР (1971). Окончил Московский университет (1931), с 1960 г.— директор Института по изысканию новых антибиотиков АМН СССР. Основные научные исследования посвящены поиску антибиотиков и изучению механизма их действия. Получил и внедрил в производство грамицидин S (1942, совместно с М. Г. Бражниковой) и ряд других антибиотиков. Лауреат Государственной премии СССР (1946).



Тироцидин

Грамицидин S и родственные антибиотики относятся к той группе пептидно-белковых веществ, биосинтез которых протекает без участия рибосомного аппарата, а осуществляется с помощью ферментных систем. В частности, в построении пептидной цепи грамицидина S принимает участие ферментативный комплекс, названный грамицидин-S-синтетазой: аминокислоты активируются в активных центрах ферментов и последовательно соединяются пептидными связями, как это показано на рисунке 170.

По сходной схеме синтезируются и депептидные антибиотики, в том числе ионофоры энниатиновой группы (см. с. 155). Соответствующие ферментные комплексы были получены и изучены Х. Клейнауфом.

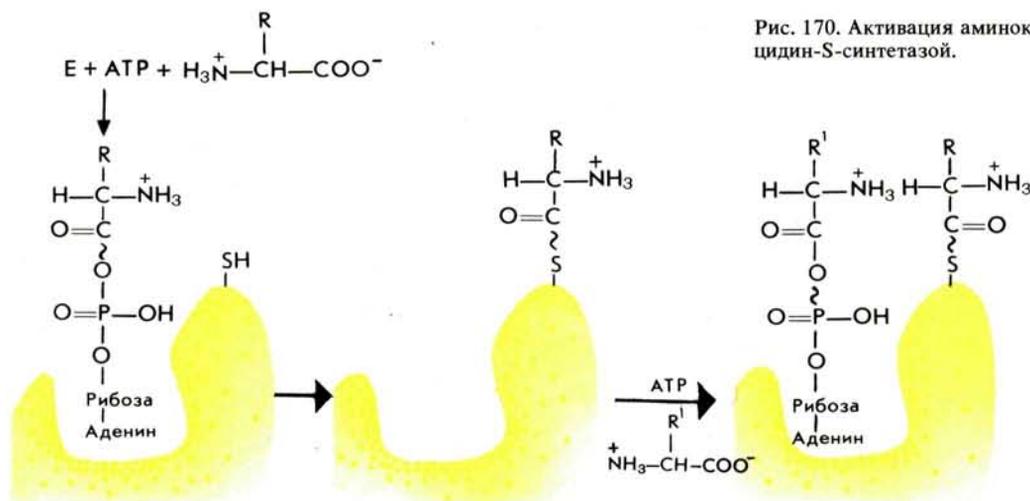
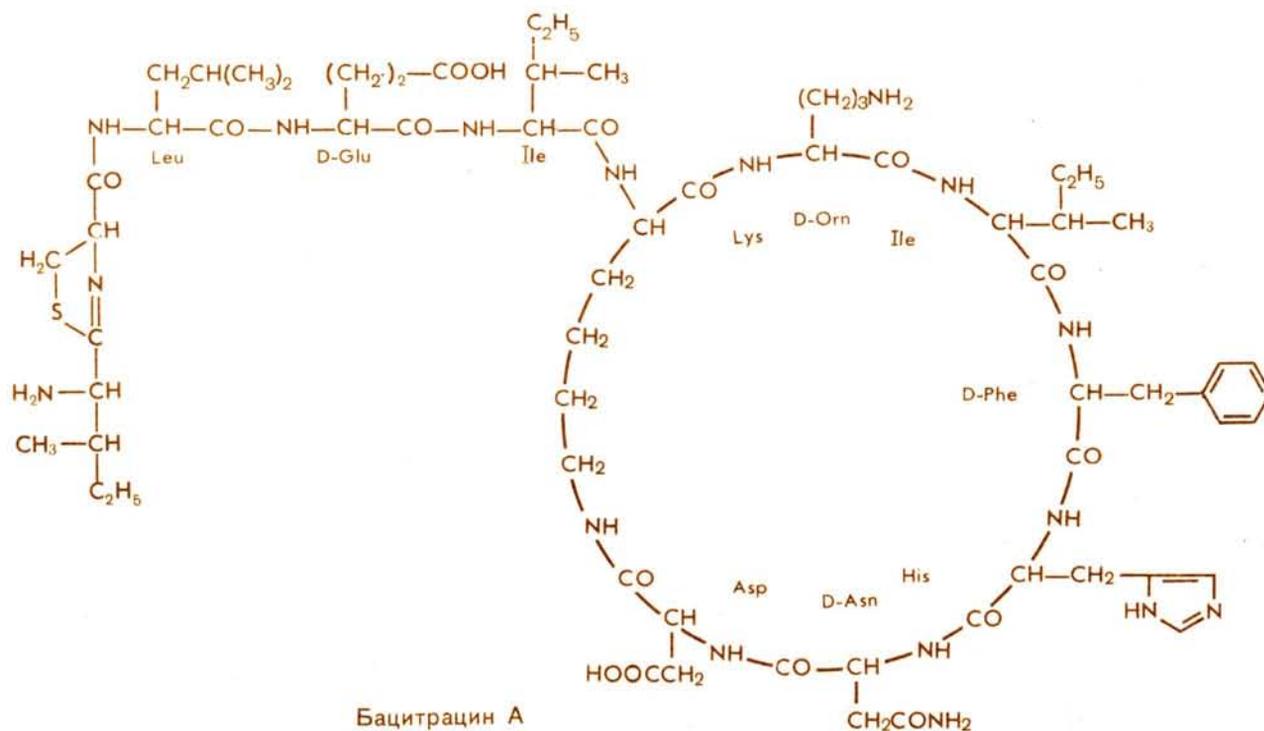


Рис. 170. Активация аминокислот грамицидин-S-синтетазой.

Бацитрацины. *Бацитрацин А* — основной представитель группы антибиотиков, открытых в 1945 г.; однако химическая формула его была установлена сравнительно недавно (1971).



Как и полимиксины (см. с. 288), он представляет собой циклолинейный пептид. Необычным элементом структуры бацитрацинов является тиазолиновое кольцо, образовавшееся, по-видимому, из С-концевого дипептида Ile—Cys.

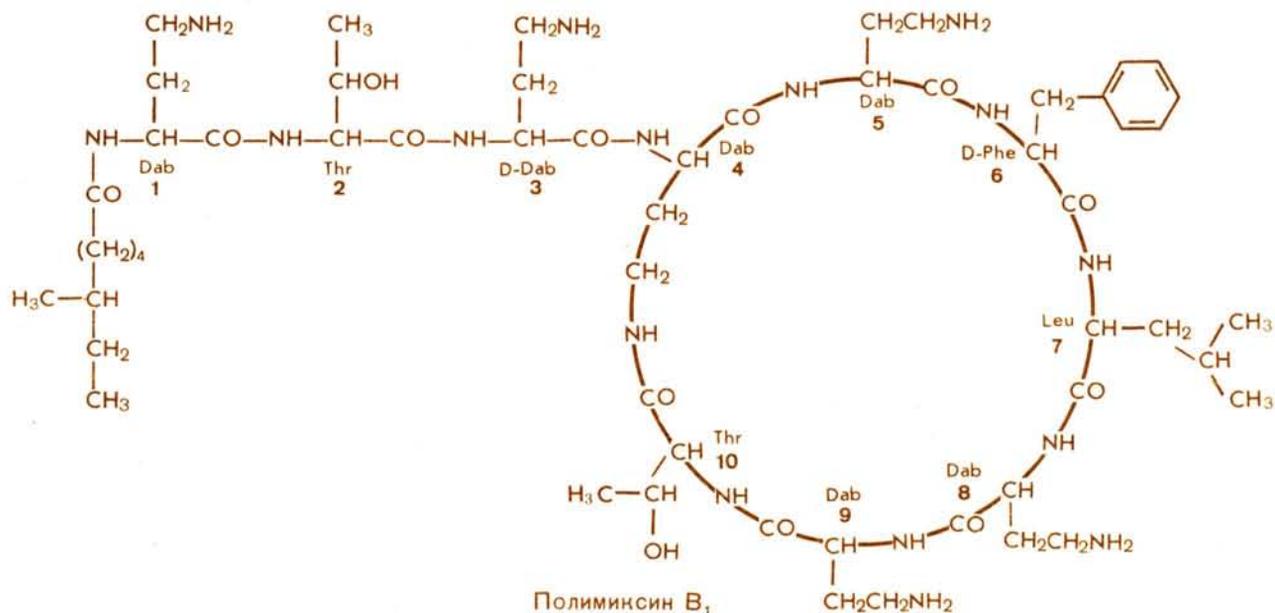
Бацитрацины весьма активны против грамположительных бактерий, напоминая по спектру действия пенициллин. В работах Дж. Стрёминджера (1971) и Д. Сорма (1974) получены данные, свидетельствующие о связывании бацитрацинами S_{55} -изопренилпирофосфата в виде тройного комплекса с ионом двухвалентного металла (Zn^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} или Ca^{2+}). При этом блокируется стадия регенерации липидного переносчика, участвующего в биосинтезе клеточной стенки бактерий, что и приводит к гибели микроорганизма.

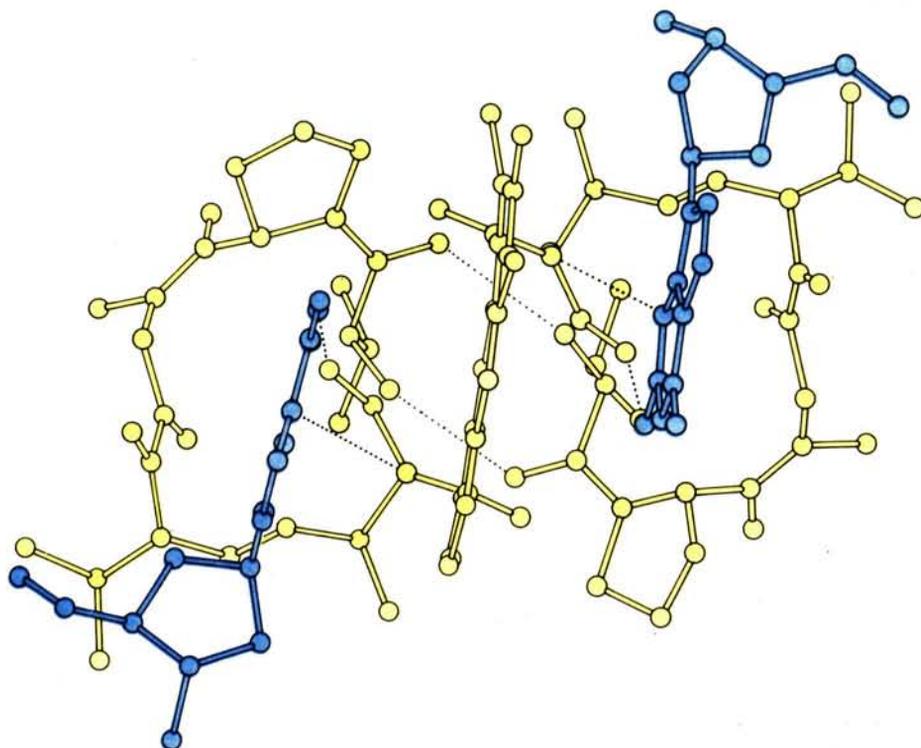
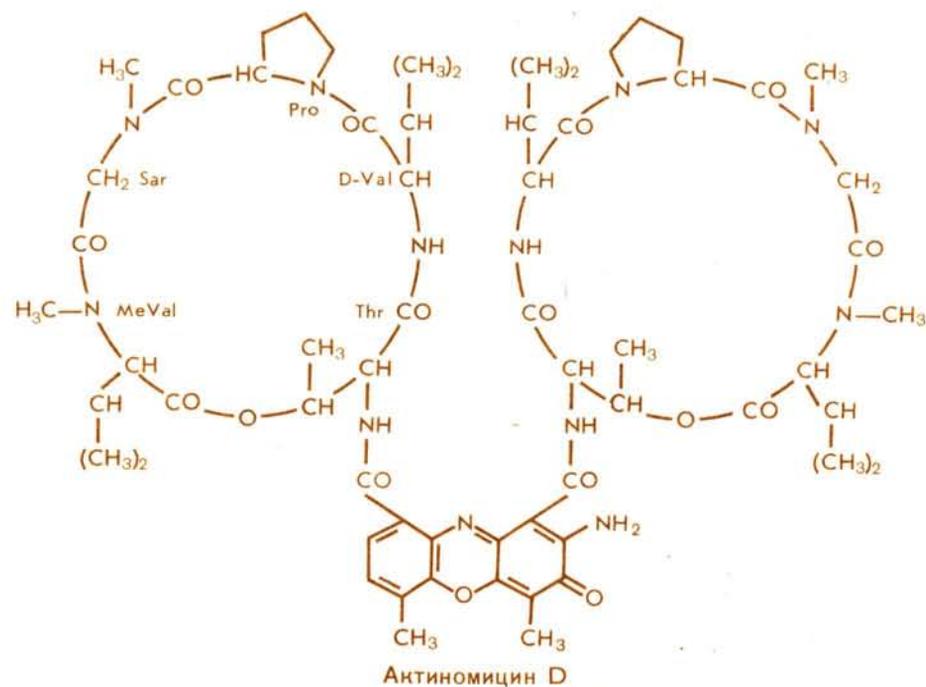
Полимиксины — группа мембрано-активных пептидных антибиотиков, имеющих циклолинейную структуру и сильноосновные свойства за счет наличия 5—6 остатков α,γ -диаминомасляной кислоты (Dab).

В качестве примера приведена формула полимиксина V_1 , установленная в 1964 г. К. Фоглером и сотр.

Полимиксины обладают ярко выраженным бактерицидным действием против большинства грамотрицательных бактерий, превосходя в этом отношении многие другие антибиотики. Мишенью действия полимиксинов является плазматическая мембрана бактерий. Показано, что полимиксины связываются с фосфатными группами кардиолипина, фосфатидилэтаноламина или других кислых липидов, нарушая барьерные функции мембраны.

С другой стороны, полимиксины обладают способностью активировать фосфолипазы внешней мембраны грамотрицательных бактерий, что также может приводить к разрушению мембраны и гибели микроорганизма.





Действие актиномицинов обусловлено способностью их образовывать устойчивые комплексы с ДНК. С помощью рентгеноструктурного анализа было выяснено пространственное строение кристаллического комплекса актиномицина D с дезоксигуанозином (М. Собелл, 1971). В комплексе актиномицин связан таким образом, что две молекулы нуклеозида располагаются с противоположных сторон хромофора, образуя многочисленные гидрофобные контакты и водородные связи.

Эхиномицин — антибиотик хиноксалиновой (хиномициновой) группы, выделен из культуры актиномицетов (*Streptomyces echinatus*); его строение было установлено в 1959 г. В. Прелогом. В основе биологического действия хиномицинов лежит их способность специфически связываться с двунитевой ДНК. Согласно данным ЯМР и теоретического конформационного анализа, эхиномицин имеет в растворе жесткую конформацию (рис. 171). Как легко видеть, оба хиноксалиновых кольца располагаются по одну сторону цикла; при взаимодействии с ДНК происходят изменения пространственного положения хромофоров, аналогичные тем, которые наблюдаются при образовании комплекса ДНК с актиномицином D.

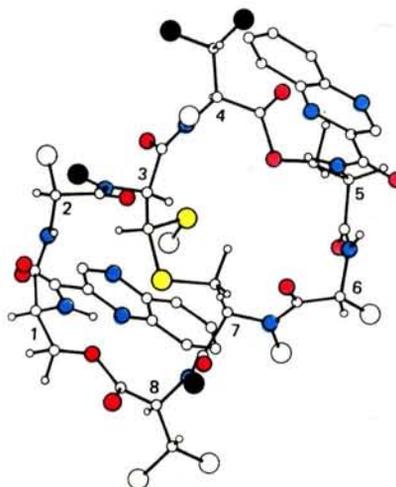
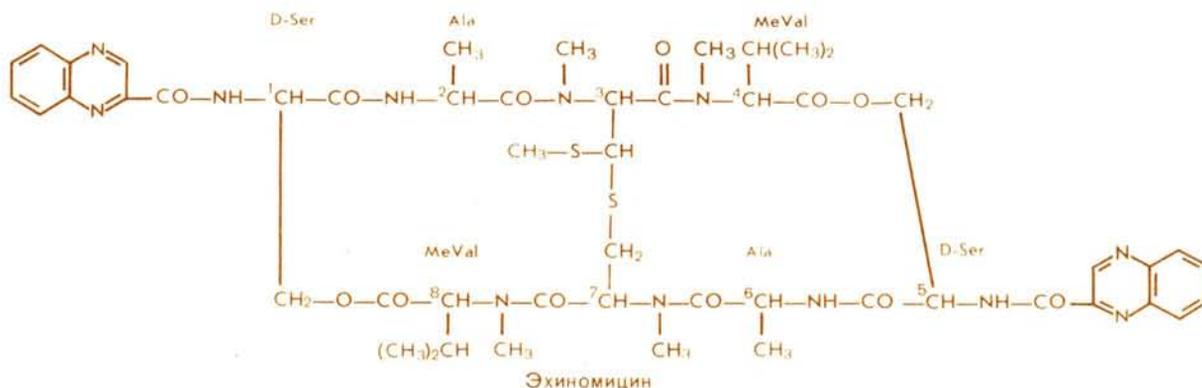


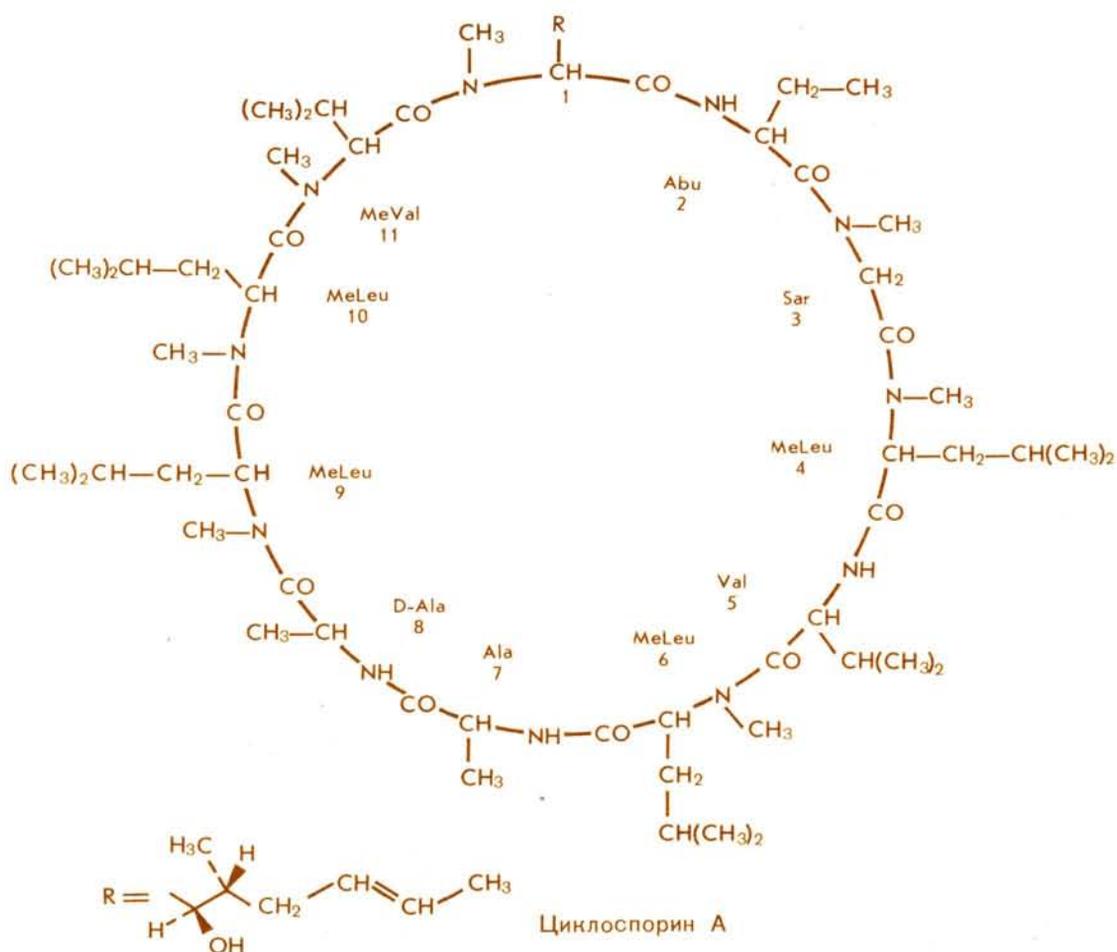
Рис. 171. Предпочтительная конформация эхиномицина в растворе.

Один из основных представителей группы — антибиотик циклоспорин А, продуцируемый микроорганизмом *Trichoderma polysporum*, — обладает выраженными иммунодепрессивными свойствами. Его строение установлено в 1976 г. с помощью химических методов и рентгеноструктурного анализа; в конформационном отношении этот циклоундекапептид аналогичен грамицидину S. Полный синтез циклоспорина А осуществлен в 1981 г. Р. М. Венгером (фирма «Sandoz», Швейцария); антибиотик выпускается фирмой в промышленных масштабах на основе биосинтетического метода.

Циклоспорин А ингибирует отторжение пересаженных органов и тканей и для этих целей широко применяется в клинике. Мишенью его действия является Т-хелперная популяция лимфоцитов.

Важнейшим регулятором иммунной системы является *тафцин*, выделенный в 1970 г. Он представляет собой тетрапептид

Thr—Lys—Pro—Arg,



являющийся фрагментом C_H2-домена иммуноглобулина G. В настоящее время получено много его синтетических аналогов, в том числе ценных в практическом отношении. Тафцин повышает цитотоксическую и цитостатическую активность против чужеродных клеток, обладает противоопухолевым и антибактериальным действием.

Большая группа иммуноактивных пептидов выделена из тимуса; они получили название *тимических гормонов* или *тимических факторов*. Так называемый *тимозин* (А. Гольдштейн, 1975) является смесью большого числа высокомолекулярных пептидов, среди которых идентифицированы тимозин α₁ (28 аминокислотных остатков), тимозин β₄ (43 аминокислотных остатка) и др.; все эти соединения регулируют активность Т-лимфоцитов. Аналогичны по биологической активности и *тимопозтины*. Относительно простой структурой среди тимических гормонов обладает *тимулин* (Г. Бах, 1975):



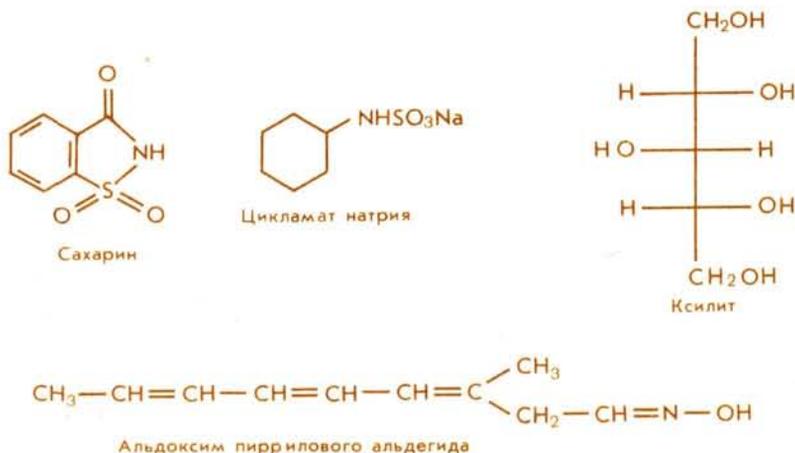
Многие тимические факторы синтезированы и используются в практике.

Особое место занимают в этой группе *гликопептиды* — фрагменты клеточных стенок бактерий (см. с. 508).

Пептиды с вкусовыми качествами

В последние годы соединения пептидно-белковой природы привлекают повышенное внимание в связи с проблемой получения веществ, обладающих ценными вкусовыми качествами. Естественно, что главные среди них — это заменители сахара.

Как известно, сахар производится в мире многими миллионами тонн, прежде всего путем переработки сахарного тростника и сахарной свеклы. В настоящее время биотехнологические методы позволяют получать сахар (сахарозу, глюкозу, фруктозу) на основе ферментативной обработки крахмала и даже целлюлозы. Тем не менее постоянно ведется поиск «сладких» веществ и среди соединений других типов — более дешевых и менее «коварных» в связи с проб-



лемой диабета. Давно применяются сахарин, цикламат натрия, ксилит и т. п. Имеются указания на «сверхсладкие свойства» альдоксима пирилового альдегида (в 2000 раз слаще тростникового сахара). Многие аминокислоты обладают сладким вкусом, причем вкусовые качества во многом определяются их стереохимией. Например, глицин, оба изомера аланина и серина — сладкие; в случае аспарагина, гистидина, лейцина, метионина, валина, триптофана, тирозина и треонина сладкими являются D-изомеры, а L-изомеры безвкусные или горькие. В то же время сладким является L-пролин.

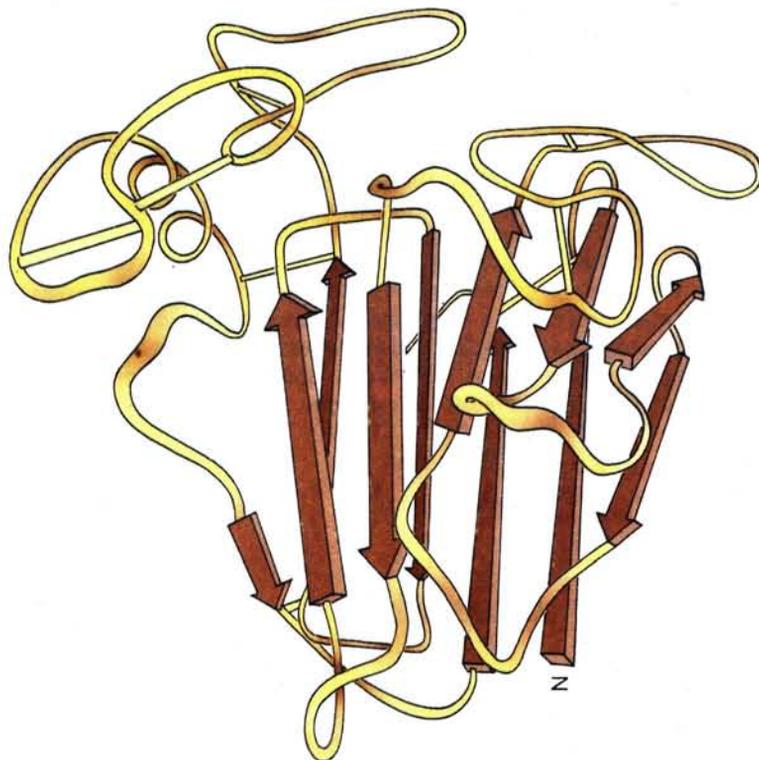


Рис. 172. Схема укладки полипептидных цепей в тауматине I.

Недавно обнаружено, что весьма сладким вкусом обладает дипептид — метиловый эфир L-аспартил-L-фенилаланина, получивший название *аспартам*

Asp—Phe—OMe .

Аспартам примерно в 200 раз слаще сахарозы, нетоксичен и уже выпускается тысячами тонн и применяется в пищу. Его главное преимущество — простота структуры, низкая калорийность. Получены сотни синтетических аналогов аспартама, выяснено, в частности, что замена L-Asp на D-Asp или L-Glu приводит к безвкусным соединениям.

В настоящее время изучается механизм биологического действия аспартама, в том числе на основе исследований физико-химических характеристик его белкового рецептора.

В природе имеются и *горькие пептиды*, например гептапептид, полученный при протеолизе казеина:



не уступающий по своему горькому вкусу хинину.

Можно упомянуть и «вкусный» пептид («delicious peptide»), выделенный в 1980 г. при обработке папаином мяса крупного рогатого скота:



К белкам, обладающим интенсивно сладким вкусом, относятся, в частности, *тауматины* и *монеллин*, выделенные из плодов ряда африканских растений (*Thaumatococcus danieli*, *Dioscoreophyllum cumminsii* и др.) и превосходящие сахар по сладкости в 100 тыс. раз (при одинаковой молярной концентрации).

Тауматины являются основными белками с молекулярной массой около 22 000 (тауматины I и II содержат по 207 аминокислотных остатков). Их молекулы построены из двух доменов, соединенных гибким 28-членным пептидным фрагментом и характеризующихся высоким процентом содержания β -структур и β -изгибов (рис. 172). Молекула монеллина имеет две нековалентно связанные пептидные цепи, включающие в целом 94 аминокислотных остатка; ряд участков тауматинов и монеллина обнаруживают структурную гомологию.

Плодовые растения, содержащие тауматины, не плодоносят вне своего природного ареала, поэтому предпринимаются попытки получать «сладкие белки» для широкого практического использования с помощью методов генной инженерии.