

Структурно-функциональная организация природных пептидов

Е.М.Попов

Московский государственный заочный институт пищевой промышленности
109803 Москва, Земляной вал, 73, факс (095) 292–6511

Обсуждены принципы структурной и структурно-функциональной организации молекул природных олигопептидов. В общем плане и на примере ангиотензина II рассмотрен подход к исследованию биологической активности пептидных гормонов в направлении от структуры к функции. Показано, что полифункциональность пептидов обусловлена их возможностью принимать в физиологических условиях целый ряд конформационных состояний. Отдельная функция пептида реализуется посредством характерной только для нее конформации из числа самых предпочтительных для свободной молекулы. Рассмотрен метод целенаправленного конструирования искусственных конформационных состояний природного гормона.

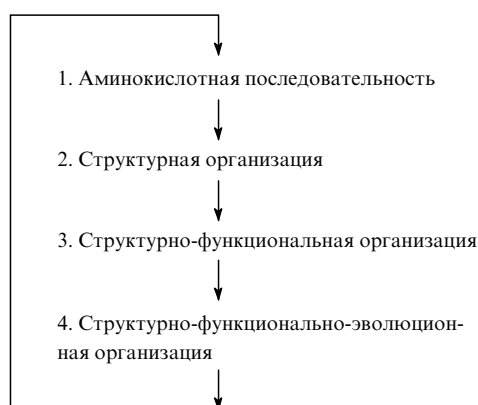
Библиография — 104 ссылки.

Оглавление

I. Введение	1004
II. Структурная организация пептидов	1005
III. Структурно-функциональная организация пептидов	1009
IV. Структура и функции ангиотензина II	1011
V. Синтетические аналоги ангиотензина	1016
VI. Полифункциональность гормона и гетерогенность рецепторов	1019
VII. Заключение	1024

I. Введение

При изучении природных олигопептидов и белков исследователи сталкиваются с необходимостью решения четырех фундаментальных задач, представленных на следующей схеме с указанием иерархических связей между ними:



Первая задача состоит в установлении химического строения соединения, а именно в определении порядка рас-

положения стандартных аминокислот в пептидной цепи. Вторая задача заключается в идентификации пространственной формы и конформационной динамики молекулы по известной аминокислотной последовательности. Третья задача — изучение зависимости биологических и физиологических свойств пептидов и белков от их молекулярно-структурной организации. И, наконец, последняя задача связана с рассмотрением этих соединений с эволюционной точки зрения, как исторических объектов. Здесь интегрируется вся предшествующая информация и формируется представление о триединстве структуры, функции и эволюции природных пептидов и белков.

Представленная схема охватывает исследования пептидов и белков всех направлений и классифицирует их по группам, образующим замкнутый цикл в системе четырех обобщенных координат (вещество, пространственная форма, функция и время). Стрелки указывают субординационные связи и тем самым устанавливают логически оправданный порядок рассмотрения фундаментальных задач в направлении от простого к сложному или, в данном случае, от структуры к функции. В настоящем сообщении изложены основы такого подхода и обсуждены его возможности в изучении свойств природных олигопептидов как в общем плане, так и на конкретном примере ангиотензина II.

Тема структурной и структурно-функциональной организации природных олигопептидов привлекает к себе большое внимание по двум причинам. Во-первых, эти соединения чрезвычайно интересны сами по себе, причем интересны как в чисто познавательном, так и в прикладном отношении. Они обладают уникальными свойствами и принимают активное участие во многих процессах жизнедеятельности. Во-вторых, повышенным вниманием к себе природные олигопептиды обязаны также родственным связям с белками. Они близки к последним по своему эволюционному происхождению и

Е.М.Попов. Доктор химических наук, профессор кафедры органической и физической химии МГИПП, член-корреспондент РАЕН. Телефон (095) 434–3241. Область научных интересов: биофизика, структура и функция белков и пептидов, молекулярная спектроскопия.

Дата поступления 25 августа 1994 г.

принадлежностью к одному химическому типу соединений. Кроме того, в биологических процессах часто происходят валентные и невалентные взаимодействия между пептидами и белками, поэтому знание свойств низкомолекулярных пептидов имеет первостепенное значение в изучении высокомолекулярных соединений той же природы.

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

II. Структурная организация пептидов

Ранее, с помощью полуэмпирического метода конформационного анализа было изучено пространственное строение многих десятков природных олигопептидов и их синтетических аналогов, содержащих от 5 до более чем 30 аминокислотных остатков.^{1–3} В результате были сформулированы следующие принципы структурной организации молекул этих соединений:²

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

2. Предпочтительные структуры олигопептида могут отличаться между собой шейпами пептидного скелета, в пределах одного шейпа (одного структурного типа) — формами основной цепи и в пределах одной формы — ориентациями боковых цепей.

3. Смещение положения равновесия между немногочисленными конформациями олигопептида осуществляется по вполне определенному низкоэнергетическому механизму, включающему ряд последовательных конформационных переходов.

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

Что же общего и чем отличаются структурные организации молекул природных олигопептидов и белков? Одно различие между ними очевидно — пространственное строение низкомолекулярных пептидов характеризуется набором структур, т.е. положением конформационного равновесия, а белков — единственной в нативных условиях трехмерной структурой. Дальнейшее обсуждение этого вопроса требует

привлечения более детальной информации о структурной организации белковых молекул. Используем для этой цели разработанные автором бифуркационную термодинамическую модель самопроизвольного свертывания природной полипептидной цепи и физическую конформационную теорию белков, позволяющую по известной аминокислотной последовательности предсказывать геометрию трехмерной структуры и количественно оценивать возможности последней к конформационным перестройкам. Подробно и в доказательном плане этот материал изложен в монографии.² Здесь лишь кратко остановимся на том, что требуется для установления генетической связи между структурными организациями природных олигопептидов и белков.

Важнейшая особенность белковой цепи заключена в специфической конформационной неоднородности природной аминокислотной последовательности, определяющей существование необратимых флуктуаций и возникновение бифуркаций (необратимых отклонений^{4,5}), а следовательно, и саму возможность спонтанного образования высокоорганизованной структуры из хаоса. Можно утверждать, что суть этого явления состоит в наличии четкой взаимообусловленности между химическим строением, конформационными свойствами и необратимыми флуктуациями. Гетерогенность аминокислотной последовательности ответственна за различие в конформационных возможностях ее отдельных участков, что, в свою очередь, порождает термодинамическую неоднородность флуктуаций, дифференциацию их на равновесные (обратимые) и неравновесные (необратимые). Сочетание флуктуаций и порядок их следования определяют содержание и направленность механизма быстрой и безошибочной самосборки белковой цепи. Такая связь присуща только эволюционно отобранным аминокислотным последовательностям.⁶ В случае же регулярных гомогенных, или даже гетерогенных синтетических полипептидов со случайным порядком аминокислот, этот беспорядочный по своему характеру процесс не имеет развития и не выводит цепь из состояния статистического клубка.

Чтобы беспорядочно-поисковый механизм смог действительно привести к свертыванию цепи, селекция бифуркационных флуктуаций не должна представлять собой перебор всевозможных комбинаций всех случайных изменений целой полипептидной цепи, количество которых и необходимое для их реализации время невероятно велики. Свертывание произойдет только в том случае, когда структурирование белковой глобулы инициируется и определенное время развивается независимо на разных участках последовательности. Это будет иметь место при чередовании в белковой цепи фрагментов, существенно отличающихся по своим конформационным свойствам. Ориентировочно их можно разделить на две группы. В первую группу входят конформационно-жесткие фрагменты, пространственное строение которых почти полностью определяется взаимодействиями входящих в них остатков аминокислот. Вторая группа включает конформационно-лабильные участки цепи. Свою окончательную пространственную форму они обретают после реализации не только ближних, но и дальних межостаточных взаимодействий. Расчеты большого числа сложных природных олигопептидов (25–35 остатков в цепи) и двух низкомолекулярных белков (нейротоксина II и трипсинового ингибитора) обнаружили в организации их пространственных структур следующие характерные черты, очевидно, общие для белковых аминокислотных последовательностей:

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

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

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

Сборка белка при соблюдении отмеченных условий начинается одновременно и практически независимо на конформационно жестких фрагментах, разделенных лабильными участками последовательности, т.е., по существу, как сборка нескольких олигопептидных молекул, связанных между собой довольно гибкими цепями. Случайный и беспорядочный перебор всех возможных флуктуаций практически автономных жестких фрагментов рано или поздно, но непременно приводит к возникновению у каждого из них бифуркационной комбинации необратимых конформационных изменений, отвечающих уникальному сочетанию флуктуаций входящих во фрагмент остатков. Время, необходимое для структурной самоорганизации пептидного участка из n остатков по беспорядочно-поисковому механизму, равно, согласно Уетлауферу,⁷ 10^{n-14} с. Следовательно, продолжительность сборки конформационно-жесткого фрагмента с $n < 12$ не превышает 10^{-2} с, т.е. вполне реально.

В белках альтернирующие вдоль цепи приблизительно той же длины конформационно-лабильные участки за это время также претерпевают серьезные изменения. Реализация у них внутренних межостаточных взаимодействий приводит к ограничению конформационной свободы. Из огромного массива случайных состояний путем все того же беспорядочного перебора обратимых и необратимых флуктуаций за время $t = 10^{-2}$ с реализуется лишь ограниченный набор относительно устойчивых и при отсутствии дальних взаимодействий изоэнергетических состояний.

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

Пространственное строение рассматриваемых природных олигопептидов, как и строение синтетических олиго- и полиаминокислот, описывается не однозначно детерминированной структурой, а положением конформационного равновесия. Весьма существенное различие состоит в том, что в природных олигопептидах конформационное равновесие относится не к огромной массе обратимо флуктуирующих форм статистического клубка искусственного пептида, а к небольшому числу низкоэнергетических бифуркационных состояний, легко мигрирующих друг в друга.

Знание принципов молекулярной структурной организации и умение количественно предсказывать исходя из аминокислотной последовательности конформационные возможности природных олигопептидов — это первый необходимый шаг к пониманию структурно-функциональной организации белковых молекул. Однако перед тем, как сделать следующий шаг в этом направлении, нужно хотя бы кратко рассмотреть еще два вопроса. Первый вопрос касается надежности результатов теоретического конформационного анализа и, следовательно, достоверности сделанных на их основе обобщений, а второй — возможности существующих экспериментальных методов исследования конформаций и перспективы перехода используемого эмпирического подхода «от функции к структуре».

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

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

В настоящее время практически полностью отсутствуют (если не считать синтетических ди- и трипептидов) кристаллографические данные о пространственном строении линейных низкомолекулярных пептидов. Рентгеноструктурный анализ удалось провести только для относительно жестких макроциклических природных и искусственных олигопептидов и олигодепсипептидов, таких как грамицидин S, антаминид, энниатин В, валиномицин и некоторых их комплексов с ионами металлов.⁸ Отдельные экспериментальные данные, полученные для этих соединений, можно сопоставить с результатами их теоретического конформационного анализа. Для оценки объективности расчетных данных такое сравнение особенно показательно, поскольку теоретическое исследование было проведено на несколько лет раньше рентгеноструктурного анализа тех же объектов.

Конформационный анализ циклических тетрадепсипептидов (Gly — Glyco)₂, (MeAla — Lac)₂, (MeVal — Hyiv)₂, состоящих из регулярно чередующихся остатков α -амино- и α -оксикислот с различными наборами конфигураций C $^{\alpha}$ (DDDD, DDDL, DLLL, DLLD, LDLD и LDDD)⁹⁻¹³, свидетельствует о наибольшей устойчивости для этих молекул *цис-транс-цис-транс*-конфигурации основной цепи, причем пептидные группы имеют *цис*-, а сложноэфирные — *транс*-конфигурацию. Кроме того, расчет показал, что введение заместителей C $^{\alpha}$ и N-метилирование лишь сужают круг разрешенных конформаций. Рентгеноструктурный анализ полностью подтвердил эти заключения, а найденные с его помощью геометрические параметры четырех диастереомеров цикло-(MeVal — Hyiv)₂ с конфигурацией атомов C $^{\alpha}$ — LDLD, DLLL, DDDL и LDDD^{8, 15-20} — количественно

совпали с теоретическими параметрами предпочтительных по энергии конформаций соответствующих молекул.^{10–12} Кристаллографические данные по энниатину В^{21, 22} и боверицину,²³ также удовлетворительно совпадают с расчетными данными для самой низкоэнергетической конформации энниатина В (см.^{24, 25}). Представление о близости теоретических и опытных значений геометрических параметров молекул цикло-тетра- и цикло-гексадецепептидов можно получить из табл. 1. Таким образом, во всех случаях, где можно провести прямое сопоставление теории с экспериментом, наблюдается хорошее количественное согласие результатов. Однако, как отмечалось, таких опытных данных немного и они относятся к достаточно жестким циклическим олигомерным пептидам и депептидам.

При исследовании пространственного строения природных пептидов в растворе широко используются физико-химические, и прежде всего оптические и резонансные спектральные методы. Но и в этом случае структурная задача для этих соединений оказывается нерешенной по целому ряду причин. Наиболее серьезная из них связана с особенностью постановки самой задачи, формулировка которой для природных олигопептидов более сложна чем для белков и синтетических олиго- и полиаминокислот. Для последующего изучения структурно-функциональной организации этих соединений недостаточно знания лишь одной глобальной конформации, как в случае белков, или представления о среднестатистическом конформационном состоянии, как в случае синтетических пептидов. Здесь требуется количественная оценка геометрических параметров ряда структур, их конформационных возможностей, взаимопревращений и вероятности реализации в различных условиях. Получение такой информации находится за пределами чувствительности и интерпретационных возможностей физико-химических методов. Более того, из-за сложности соединений и недостаточной разработанности физических основ соответствующих явлений, ни один из методов пока не позволяет однозначно и достаточно полно описать даже одно, доминирующее в растворе конформационное состояние пептида, используя для этого результаты собственных экспериментальных измерений.

Этот вывод очевиден из анализа данных практически всех исследований структуры олигопептидов, проведенных с помощью физико-химических методов. Например, к расшифровке пространственного строения октапептидного гормона ангиотензина II был привлечен практически весь комплекс существующих методов: спектры ЭПР, ЯМР ¹H и ¹³C, кривые дисперсии оптического вращения (ДОВ) и кругового дихроизма (КД), ИК- и Раман-спектры, флуоресцентный анализ, изотопный обмен и др. В результате разными авторами было предложено семь совершенно различных моделей пространственной структуры октапептидного гормона, отвечающих данным одного или сразу нескольких методов. Однако ни одна из этих моделей, отражающих состояние только основной цепи молекулы, не удовлетворяла всей совокупности экспериментальных фактов.²⁶ Подобная неопределенность свойственна также трактовкам многочисленных экспериментальных данных о структуре нейрогипофизарного гормона окситоцина,²⁷ хотя в этом случае изучение структуры облегчалось наличием дисульфидной связи между первым и шестым аминокислотными остатками.

На примере ангиотензина и окситоцина, наиболее детально и всесторонне изучаемых в последние два десятилетия пептидных гормонов, убедительно продемонстрирована ограниченность известных физико-химических методов в познании структурной организации природных пептидов. Не отрицая ценности экспериментальных данных, можно тем не менее говорить о невозможности в настоящее время решения только на их основе структурной задачи в требуемом объеме — установления геометрии и конформационной

динамики низкоэнергетических структур природного пептида. Господствующий в конформационных исследованиях пептидов, как, впрочем и белков, чисто эмпирический подход далеко не в полной мере адекватен природе изучаемого явления. В наличии существенного разрыва между требуемой информацией и возможностями эксперимента и заключается причина отсутствия в течение длительного времени (с конца 60-х годов) ощутимого прогресса в этой области.

На сегодняшний день возможности существующих физико-химических методов ограничены получением данных в пользу той или иной гипотетической или априорно рассчитанной структуры. Кроме того опытная проверка результатов теоретического конформационного анализа пептидов имеет свои особенности. С одной стороны, хорошее совпадение результатов расчета с экспериментальными данными, хотя и является положительным фактом, однако не может служить надежным критерием правильности теоретического предсказания. Кроме того, отсутствие совпадения, как это ни кажется странным, также не означает бесспорного доказательства нереальности результатов расчета. Различия теоретических и опытных данных может быть вызвано причинами, не играющими определяющей роли в последующем изучении структурно-функциональной организации пептида. Например, четко наблюдаемое несовпадение будет иметь место при правильном определении всего набора низкоэнергетических конформаций и удовлетворительной оценке геометрии каждого состояния, но при неполном соответствии теоретически найденного расположения конформаций действительному порядку в шкале энергии (достаточна разница в 1.5–2.0 ккал·моль^{–1}).

Было предложено два способа для проверки результатов расчета.²

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

Согласно теории^{2, 28, 29} и термодинамической гипотезе Анфинсена,³⁰ окисление атомов серы цистеинов, образующих в пептидах дисульфидные мостики, возможно благодаря стерической предрасположенности соответствующих участков аминокислотной последовательности к таким конформационным состояниям, в которых остатки Cys оказываются сближенными, а их боковые цепи имеют необходимую для создания связи S–S взаимную ориентацию. В процессе свертывания полипептидной цепи происходит сближение цистеинов в самых низкоэнергетических конформациях линейной последовательности за счет согласованных стабилизирующих невалентных взаимодействий между всеми остатками цепи. При многостадийном конформационном анализе достаточно сложного пептида приход на завершающем этапе расчета к наиболее низкоэнергетическим конформациям можно ожидать только в случае адекватности всех положенных в основу расчета теоретических предпосылок и верного количественного описания конформационного состояния молекулы. Способ внутреннего контроля был апробирован при анализе большого количества весьма сложных цистинсодержащих пептидов: нонапептидных нейрогипофизарных гормонов,²⁷ апамина,³¹ тертиапина³² и МСД-пептида,³³ содержащих соответственно 18, 21 и 22 аминокислотных остатка, в том числе цистеин, образующий две дисульфидные связи, а также инсектотоксина³⁴, содержащего 36 остатков, из которых восемь цистеинов, и др.^{1, 2}

При втором способе оценки корректность конформационного анализа проверяется путем сопоставления результатов расчета конформационных возможностей олигопептидных фрагментов с опытными данными о геометрии кристаллической структуры белка. Такое сравнение в настоя-

Таблица 1. Теоретические и экспериментальные значения двугранных углов основных цепей молекул LDLDLD-цикло-о-тексадецепептидов и LDLD-цикло-тетрадецепептидов

Молекула (метод и ссылка	Двугранные углы, ^a град.																	
	ϕ_1	ψ_1	ω_1	ϕ_2	ψ_2	ω_2	ϕ_3	ψ_3	ω_3	ϕ_4	ψ_4	ω_4	ϕ_5	ψ_5	ω_5	ϕ_6	ψ_6	ω_6
<i>цикло-[(MeAla – Lac)₃]</i> (Расчет ²⁴)	–103	171	180	74	–136	180	–103	171	180	74	–136	180	–103	171	180	74	–136	180
<i>цикло-[(MePhe – Hiv)₃]</i> (PCA ²²)	–103	167	180	74	–133	179	–101	166	–177	73	–164	178	–78	157	178	90	–136	–179
<i>цикло-[(MeAla – Lac)₂]</i> (PCA ¹²)	–100	125	180	73	47	0	–100	125	180	73	47	0	–	–	–	–	–	–
<i>цикло-[(MePhe – Hiv)₂]</i> (PCA ²⁰)	–98	136	175	70	44	0	–102	129	177	82	39	2	–	–	–	–	–	–

^a Отсчет углов ϕ , ψ и ω соответствует номенклатуре IUPAC-IUB.

щее время реально для двух низкомолекулярных белков — бычьего панкреатического трипсина ингибитора (58 аминокислотных остатков в цепи) и нейротоксина II (61 аминокислотный остаток), для которых впервые в научной практике был выполнен априорный расчет трехмерных структур.^{35, 36} Приведем данные для трипсина ингибитора, пространственное строение которого описывается приблизительно 300-ми двугранными углами, определяющими геометрию всех основных и боковых цепей (φ , ψ , ω и χ). Из сопоставления расчетных значений этих углов с экспериментальными значениями, полученными с помощью рентгеноструктурного анализа с разрешением 1.5 Å, следует, что найденная априорно конформация молекулы ингибитора полностью соответствует кристаллографической структуре. Среднеквадратичные отклонения опытных и теоретических значений двугранных углов составляют 13, 13 и 9° для углов φ , ψ и ω соответственно. В пределах ошибок рентгеноструктурного анализа белков хорошего разрешения (1.5–2.0 Å) находится также величина среднеквадратичного отклонения двугранных углов боковых цепей χ (18°).

Таким образом, достоверность и достаточно высокая точность результатов теоретического конформационного анализа олигопептидов подтверждается при самоконтролируемом расчете по автоматическому образованию правильной системы дисульфидных связей, а при расчете белковых молекул — по совпадению геометрии теоретической и кристаллографической структур.

III. Структурно-функциональная организация пептидов

В настоящее время, как и много лет назад, изучение механизмов физиологического действия пептидных гормонов проводится как при отсутствии минимально необходимой информации о сопряженных рецепторах, так и без знания структурной организации самих природных пептидов. Исследования, как правило, строятся на результатах кинетических измерений и биологических испытаний гормона и его синтетических аналогов, причем последние выбирают методом проб и ошибок, т.е., строго говоря, вслепую. Таким образом, в изучении природных олигопептидов господствует чисто эмпирический подход от функции к структуре.

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

При использовании подхода «от функции к структуре» отсутствие объективной информации о пространственной организации пептидов, являющейся естественным промежуточным звеном между химическим строением и биологической активностью соединений, компенсируется феноменологическими описаниями, а часто просто фантазиями авторов. В литературе имеется множество всякого рода гипотетических представлений, иногда взаимоисключающих друг друга, о структурной организации пептидов. Предложенные трактовки механизмов действия природных пептидов имеют

сугубо описательный характер и лишены предсказательной возможности.³⁷ В этом легко убедиться на примере работ, посвященных ангиотензину,²⁶ брадикининпотенцирующим пептидам^{38, 39} и нейрогипофизарным гормонам.²⁷

Итак, следует признать, что чисто эмпирический путь к установлению прямой связи между биологической активностью и химическим строением является малоэффективным, а в познавательном, чисто научном отношении, — бесперспективным. Необходимо изменение направления исследований на противоположное, т.е. использование подхода «от структуры к функции».

При решении задачи о структурно-функциональной организации природных олигопептидов будем считать известными аминокислотную последовательность гормона и спектр его физиологического действия с количественными оценками каждой функции. Если известно химическое строение пептида, то можно рассчитать коонформационные возможности молекулы и выявить набор потенциально активных низкоэнергетических форм. На основе этих данных требуется установить зависимость между электронноконформационными и физиологическими свойствами природного пептида. Физиологические свойства пептидов можно определить в процессе их взаимодействия с рецепторами, в то время как информация об организации сопряженных рецепторов или полностью отсутствует, или крайне скудна, и в нашем последующем рассмотрении мы вынуждены будем, обсуждая свойства белковых рецепторов, привлекать гипотетические представления об их конформационных и функциональных особенностях.

Прежде всего мы предполагаем, что совершающиеся в живых организмах пептид-белковые взаимодействия, независимо от строения конкретного объекта и характера биологической функции, имеют единую физико-химическую природу. Следовательно, с общей естественно-научной позиции все многочисленные и чрезвычайно разнообразные функции пептидов и белков можно подразделить на две группы явлений — физических и химических. Первые осуществляются посредством невалентных взаимодействий пептидов и белков между собой и с молекулами иной природы. Они могут быть статическими, как в случае структурных белков, или динамическими, как в случае активного транспорта метаболитов. Химические функции, наряду с невалентными, непременно включают валентные взаимодействия, приводящие к обратимым или необратимым изменениям химического строения молекул. Примером могут служить ферментативные реакции, в которых реализуется весь комплекс взаимодействий, как невалентных (физических), так и валентных (химических). Сделанное выше допущение предполагает, что взаимодействия пептидного гормона с белковым рецептором по своей сути аналогичны взаимодействиям пептидного субстрата с протеолитическим ферментом. Если это так, то особенности структурной и структурно-функциональной организации гормона и субстрата совпадают, то же можно сказать о рецепторе и ферменте. Что касается принципов структурной организации молекул пептидных субстратов и пептидных гормонов, то их идентичность надежно установлена.

Особенности структурно-функциональной организации молекул ферментных белков были выявлены ранее с помощью априорных (т.е. в направлении «от структуры к функции») расчетов многостадийных механизмов элементарных актов биокатализа α -химотрипсина и β -трипсина.^{40, 43} В основу расчетов была положена разработанная автором общая теория биокатализа.⁴⁴ В достаточно полном виде особенности структурно-функциональной организации ферментов могут быть сформулированы следующим образом:

1. Активный центр нативного фермента predisposed, во-первых, к сорбции специфического субстрата в конформации, которая в свободном состоянии молекулы является одной из наиболее предпочтительных, и, во-вторых, к

вполне определенным собственным конформационным изменениям, необходимым для последующих химических взаимодействий.

2. Невалентные фермент-субстратные взаимодействия и образование комплекса Михаэлиса не приводят ни в молекуле субстрата, ни в молекуле фермента к стерическим напряжениям или принудительным деформациям. Имеющие место на этой стадии катализа конформационные изменения происходят исключительно благодаря взаимодействиям стабилизирующего характера, а не за счет неблагоприятных контактов между атомами фермента и субстрата, которые просто отсутствуют.

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

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

5. Самые низкоэнергетические конформационные состояния комплексов на всех стадиях каталитического акта соответствуют продуктивной взаимной ориентации реагирующих атомных групп фермента и субстрата, т.е. такому их взаимному расположению, которое в максимальной степени предрасположено к их целенаправленному химическому взаимодействию. Непродуктивные конформации фермент-субстратных комплексов энергетически значительно менее предпочтительны и их реализация маловероятна. Переход между всеми химически нестабильными промежуточными состояниями сопровождается незначительными и не вызывающими стерических напряжений конформационными изменениями.

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

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

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

Всем отмеченным условиям удовлетворяют следующие принципы структурно-функциональной организации природных олигопептидов.^{1, 27, 39}

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

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

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

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

Первый шаг, как отмечалось, заключается в решении прямой структурной задачи олигопептида, т.е. в определе-

нии для него набора наиболее вероятных низкоэнергетических конформационных состояний. Мы исходим из предположения, что только предпочтительные по энергии конформации или часть их могут представлять собой те физиологически активные структуры олигопептида, посредством которых осуществляются его функции.

Следующий шаг в определении зависимости между структурой и биологическим действием основывается, с одной стороны, на знании геометрии и конформационных свойств всех актуальных для физиологии структур исследуемого пептида, а с другой — на данных о всем спектре его действия. Таким образом, возникает проблема соотнесения набора известных конформаций с набором известных функций, т.е. выяснения для каждого физиологического действия пептида актуальной конформации. Эта задача в отсутствие конкретной информации о геометрии белкового рецептора не имеет однозначного решения. Ситуация значительно проще в аналогичной по своей постановке задаче о фермент-субстратных взаимодействиях, где известны не только организационные принципы молекул, но и их конформационные возможности и трехмерные структуры.

Очевидно, актуальным для реализации функции здесь будет то единственное низкоэнергетическое конформационное состояние свободного субстрата, которое окажется комплементарным геометрии активного центра фермента. В нашем случае активный центр рецептора неизвестен, а поэтому выбор без дополнительной информации невозможен.

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

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

Предложенный нами метод решения обратной структурной задачи основан на количественной конформационной теории природных пептидов и белков,^{2, 28, 29} в частности на оценке особой роли ближних взаимодействий в пространственной организации эволюционно отобранных аминокислотных последовательностей и использовании естественной классификации пептидных структур.²⁹ Подробно метод опи-

сан в работе¹. Он позволяет до синтеза и биологического испытания целенаправленно конструировать искусственные аналоги, пространственное строение которых отвечает набору низкоэнергетических, физиологически активных конформационных состояний природного олигопептида.

Порядок проведения работы в этом направлении может соответствовать следующей схеме:

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

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

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

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

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

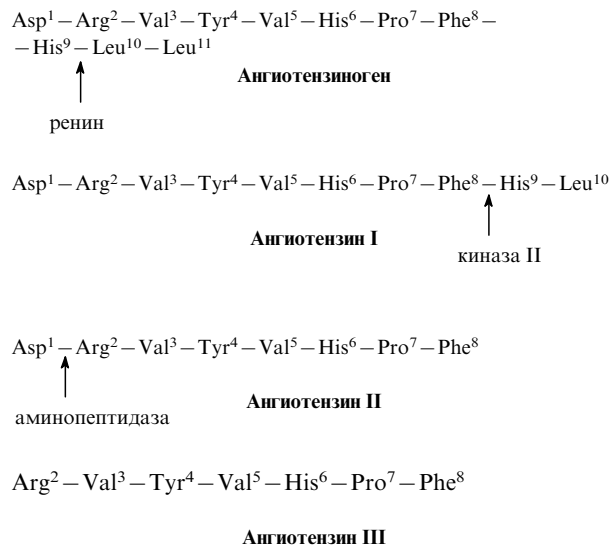
В последующем изложении рассматриваются две взаимосвязанные и одновременно решаемые задачи. Одна из них имеет более частный характер и сводится к установлению структурно-функциональной организации гормона ангиотензина II с помощью описанного выше подхода. Вторая — имеющая более общий характер, заключается в апробации использованного в конкретном анализе подхода и в оценке его реальных возможностей. Выбор ангиотензина II как объекта рассмотрения был обусловлен тем обстоятельством, что на сегодняшний день этот природный олигопептид является наиболее широко изученным, а поэтому самым подходящим для проверки нового подхода.

IV. Структура и функции ангиотензина II

Ангиотензин II, октапептидный тканевый гормон, входит в ренин-ангиотензиновую систему, в которой осуществляется его биогенез и распад. Ангиотензин II — самый мощный из известных прессорных агентов в системе кровообращения. Он стимулирует сужение периферических артериол по всему организму, и тем самым повышает артериальное давление. Помимо этого ангиотензин II активизирует секрецию ряда гормонов (главным образом альдостерона), влияет на работу сердца, печени, центрального и периферического отделов нервной системы, а также вызывает ряд других реакций в организме млекопитающих. В табл. 2 перечислены известные функции гормона с указанием мест их проявления в организмах.

Непосредственный предшественник ангиотензина II — декапептид ангиотензин I — образуется, согласно приведенной ниже схеме, из глобулярного белка крови ангиотензиногена при действии протеолитического фермента ренина.

Почти все ткани обладают пептидной активностью, быстро разрушающей ангиотензин II. Из плазмы крови млекопитающих выделены две разновидности ангиотензина II. Одна из них приведена на схеме, другая отличается от нее остатком Ile в положении 5.



Химический синтез ангиотензина II в 1961 г.⁵⁵ положил начало изучению его физиологических функций. С помощью многочисленных синтетических аналогов гормона удалось выяснить, что природный пептид взаимодействует с рядом рецепторов, расположенных в различных тканях организма млекопитающих, и обладает достаточно широким спектром биологического действия.

В литературе опубликовано большое число работ, посвященных исследованию пространственного строения ангиотензина II в растворе. В них использован практически весь арсенал существующих физико-химических методов: тонкопленочный диализ,⁵⁶ титрование ионогенных групп,⁵⁷ водородный обмен,⁵⁸ все виды оптической и резонансной молекулярной спектроскопии^{59–62} и ряд других. Результаты исследований и их интерпретация весьма противоречивы. Разными авторами было предложено большое число существенно отличающихся друг от друга структур ангиотензина II.²⁶ Каждая из них касается исключительно основной цепи молекулы и удовлетворяет лишь ограниченному кругу экспериментальных данных (см., например,^{26, 45, 58, 63, 64}). Положение боковых цепей аминокислотных остатков, составляющих большую часть молекулы и формирующих ее конформа-

ционное состояние, при обсуждении структуры гормона вообще не рассматривалось.

Противоречивыми оказались первые же исследования ангиотензина II методом диализа на тонких пленках. В одних работах^{65, 66} сделан вывод о том, что молекула гормона в растворе имеет одну компактную форму, а в другой⁵⁶ предположено наличие конформационного равновесия двух форм.

Не менее противоречивы выводы разных авторов, сделанные из анализа кинетических данных по изотопному замещению протона в водородных связях ангиотензина II. Шерага и соавт.⁶⁷ отмечают одинаковую скорость обмена всех амидных протонов, Ленкинский и соавт.⁶⁸ говорят об аномально низкой скорости обмена амидного протона His⁶, а Блейх и соавт.⁶⁹ выделяют по этой же причине остатки Val³ и Val⁵. В работе⁶³ амидные протоны разделены по скорости обмена на три группы, причем к группе с наибольшими скоростями отнесены протоны Asp¹ и Arg². В классификации, предложенной в работе⁷⁰, все обменивающиеся протоны разделены на четыре группы, причем амидные протоны всех остатков ангиотензина II, за исключением Asp¹ и Phe⁸, отнесены к одной группе, имеющие одинаковую скорость обмена.

По значениям констант диссоциации ионогенных групп гормона, полученных потенциометрическим титрованием⁵⁷ и с помощью спектров ЯМР и КД,⁷¹ сделан вывод о сближенности N- и C-концевых групп пептидной цепи, допускающей их взаимодействие. Расстояние между группами значительно меньше соответствующего расстояния для ангиотензина в конформации статистического клубка. В работе⁷¹, кроме того, предположено, что все ионогенные группы доступны растворителю, а имидазольное кольцо остатка His⁶ взаимодействует с фенильным кольцом остатка Tyr⁴ и удалено от остатка Phe⁸.

Спектры ДОВ и КД, по мнению Фарманджана и соавт.,^{72, 73} свидетельствуют о наличии в молекуле ангиотензина II антипараллельной структуры. Подобным же образом интерпретируются ими колебательные спектры гормона.⁶⁰

Ряд работ посвящен исследованию спектров ЯМР ангиотензина II, дающих наибольшую информацию о пространственном строении молекулы. Однако единства в интерпретации экспериментальных данных нет и здесь. Одни авторы считают, что спектры свидетельствуют о существовании ангиотензина II в растворе в одной конформации, имеющей преимущественно вытянутую форму. Другие⁷⁵ делают вывод о том, что молекула имеет свернутую форму, в которой ароматические боковые цепи остатков Tyr⁴ и His⁶ располагаются параллельно друг другу и эффективно взаимодействуют, а карбонильная группа остатка Asp¹ образует водородную связь с аминогруппой остатка Tyr⁴. Изучение времени ¹³C-спин-решеточной релаксации привело авторов работы⁷⁶ к выводу о наличии большой конформационной подвижности первых двух остатков и отсутствии загиба в этой части молекулы. Авторы работы⁷⁷, используя тот же метод, пришли к иному заключению. Они считают, что все остатки ангиотензина II, за исключением остатка Tyr⁴, имеют примерно одинаковую конформационную свободу; в наибольшей степени ограничена подвижность боковой цепи остатка Tyr⁴, взаимодействующей со многими остатками молекулы. Вицинальные константы всех аминокислотных остатков ангиотензина II^{70, 78, 79} имеют значения, удовлетворяющие любым величинам для каждого остатка в низкоэнергетических областях R и B, и, следовательно, ²⁷ комбинациям конформационных состояний остатков в пептидной цепи молекулы.

О причинах малой эффективности физико-химических методов исследования пространственного строения олигопептидов уже говорилось достаточно подробно. Напомним лишь, что для изучения структурно-функциональной организации молекул этих соединений недостаточно знания только

Таблица 2. Основные функции ангиотензина II и места их реализации в организме млекопитающих

Функции	Органы и ткани	Ссылки
Стимуляция сокращения гладких мышц	Гладкие мышцы артериол	45
Регуляция секреции альдостерона	Корковый слой надпочечников	46
Регуляция артериального давления, секреции вазопрессина, усиление жажды и солевого аппетита	Головной мозг (ствол, гипоталамо-гипофизарная система, образование нейронального круга жажды и др.)	47–49
Регуляция почечной гемодинамики, секреции ренина, проницаемости стенок почечных канальцев	Почки (почечные артериолы, стенки почечных канальцев, клетки юкстагломерулярного аппарата)	50–52
Увеличение силы сердечных сокращений	Сердечная мышца	53
Стимуляция секреции катехоламинов	Мозговой слой надпочечников	54

Таблица 3. Количество совпадающих по форме основной цепи низкоэнергетических конформаций, рассчитанных в работах ^{26, 80–83}

Литературный источник	Де Коэн, Ралсон (1977) ⁸⁰	Галактионов, Никифорович и др. (1979) ²⁶	Никифорович, Галактионов, Чипенс (1983) ⁸¹	Марчионини, Мейгзети, Премилла (1983) ⁸²	Никифорович, Вейстерман и др. (1987) ⁸³
80	10	1	1	2	0
26	1	6	4	0	2
81	1	4	5	0	2
82	2	0	0	5	0
83	0	2	0	0	6

глобальной, т.е. самой выгодной по энергии конформации. Здесь требуется количественная оценка геометрических параметров целого набора структур, их конформационных возможностей и вероятности реализации в различных условиях. Получение такой информации находится пока за пределами чувствительности и интерпретационных возможностей физико-химических методов, поэтому к решению перечисленных задач был привлечен полумпирический метод конформационного анализа. Однако и здесь полученные результаты достаточно скромны и противоречивы. В табл. 3 приведены результаты расчетов пространственного строения ангиотензина II, выполненные разными авторами в разное время.^{29, 80–83} Сопоставление показывает, что найденные для одного и того же гормона наборы низкоэнергетических конформаций не совпадают. Между тем все они не противоречат данным очень широкого для этого соединения круга экспериментальных исследований. Причины столь значительных расхождений подробно обсуждены в монографии². Поэтому ниже мы кратко отметим лишь некоторые особенности подхода Галактионова и соавт.^{26, 81} к конформационному анализу природных олигопептидов. С нашей точки зрения, он более последователен в решении прямой структурной задачи, чем подходы, использованные в работах^{80, 82}.

С целью уменьшения числа рассматриваемых конформаций при одновременном расширении критического интервала энергии Галактионов и соавт.^{26, 81} предварительно рассматривали модели, в которых все аминокислотные остатки, кроме Arg и Pro, заменены остатками аланина. Далее для модельного пептида определялись все возможные оптимальные конформации, лучшие из которых служили затем исходными структурными вариантами основной цепи реального пептида. В основе этой процедуры лежит принципиально неправильное, по нашему мнению, предположение о

доминирующей роли основной цепи в определении конформационных возможностей пептидов.

Если бы это было так и составляющая пептидный остов, треть всех атомов, действительно детерминировала положение остальных двух третей атомов, принадлежащих боковым цепям, то все природные олигопептиды и белки должны были бы иметь или одинаковые формы основной цепи, или очень ограниченное их количество. Что же касается синтетических олиго- и полипептидов, состоящих из остатков глицина и аланина, фактически лишенных боковых цепей, то их пространственное строение в этом случае должно было бы описываться единичными жесткими структурами, а не состоянием статистического клубка, как это имеет место в действительности. Таким образом, предположение Галактионова и соавт.^{26, 81} далеко от реальной картины. Вариации пространственных форм у белков почти столь же множественны, как и вариации порядка расположения в этой цепи 20 стандартных аминокислотных остатков.

И на первой, и на второй стадии расчета, где для выбранных пространственных форм основной цепи ведется поиск оптимальной взаимной ориентации боковых цепей исследуемого пептида, акцент делался главным образом на электростатических взаимодействиях ионогенных групп (считалось, что они являются главным фактором структурной стабилизации). С этим также трудно согласиться, поскольку укладка пептидной цепи в нативную конформацию или (при наличии, как в случае олигопептидов, ряда низкоэнергетических структур) установление конформационного равновесия происходит в водном растворе в физиологических условиях, препятствующих эффективному электростатическому взаимодействию, почти полностью сводя его на нет ($\epsilon = 81$).

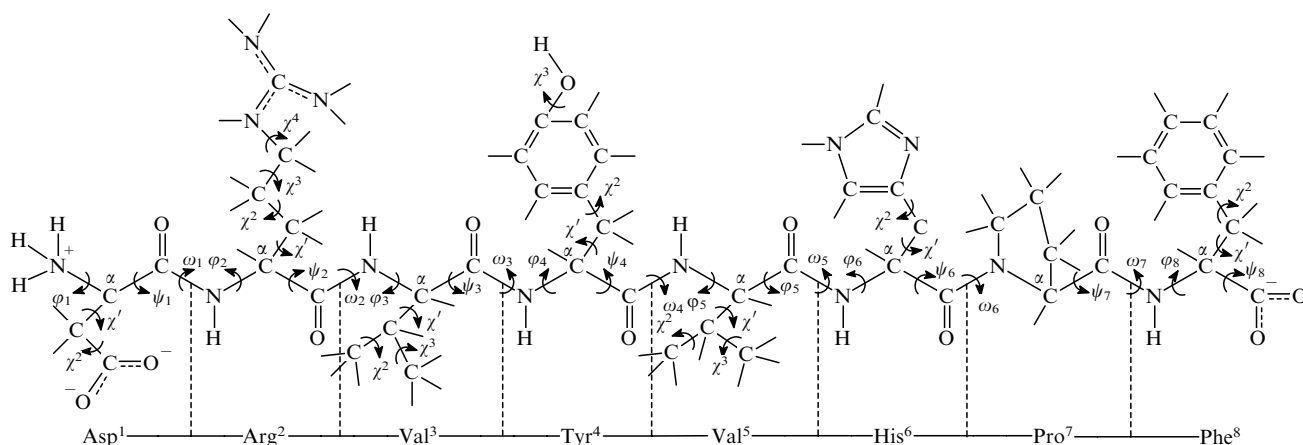
**Рис. 1.** Расчетная модель молекулы ангиотензина II

Таблица 4. Относительная энергия (ΔU , ккал · моль⁻¹) и энергетические вклады в ккал · моль⁻¹ невалентных ($U_{\text{нв}}$), электростатических ($U_{\text{эл}}$) и торсионных ($U_{\text{торс}}$) взаимодействий предпочтительных оптимальных конформаций молекулы ангиотензина II

Группа и номер конформации	Шейп	Конформация	ΔU	$U_{\text{нв}}^a$	$U_{\text{эл}}$	$U_{\text{торс}}$
A_1	fe	$R_{23} B_{1212} R_{222} B_{212} R_{122} B_{31} R R_{11}$	0	-38.4	-3.5	4.2
A_2	ff	$R_{23} R_{3222} R_{222} B_{212} R_{122} B_{31} R R_{11}$	0.9	-41.4	-0.9	5.5
A_3	ff	$R_{21} R_{3222} R_{222} B_{212} R_{122} B_{31} R R_{11}$	3.5	-38.0	-1.4	5.2
A_4	fe	$R_{23} B_{1212} R_{222} B_{212} R_{122} B_{31} R R_{11}$	4.0	-36.7	-0.3	3.1
B_1	ff	$R_{23} R_{3222} R_{222} B_{212} B_{222} B_{11} B B_{31}$	3.5	-38.4	0.9	3.2
B_2	ee	$B_{21} B_{1222} R_{222} B_{212} B_{222} B_{11} B B_{31}$	3.7	-36.7	0.3	3.1
B_3	fe	$R_{21} B_{1222} R_{222} B_{212} B_{222} B_{11} B R_{31}$	4.4	-36.8	0.5	3.0
B_4	ee	$B_{21} B_{1222} R_{222} B_{212} B_{222} B_{11} R R_{11}$	4.6	-36.3	-1.1	4.3
B_5	fe	$R_{23} B_{1222} R_{222} B_{212} B_{222} B_{11} R R_{11}$	6.0	-36.0	0.1	4.1
B_6	ef	$B_{13} R_{2122} R_{222} B_{212} B_{222} B_{11} B R_{31}$	7.0	-34.1	0.8	2.6
C_1	$ff-efe-ee$	$R_{23} R_{3222} B_{122} R_{312} B_{222} B_{11} B B_{31}$	7.5	-33.2	0.2	2.8
D_1	$ff-eee-ee$	$R_{23} R_{3222} B_{222} B_{112} B_{222} B_{11} B B_{11}$	7.8	-33.7	0.7	3.2
E_1	$fe-fff-ef$	$R_{23} B_{1222} R_{222} R_{312} R_{222} B_{31} R R_{11}$	7.8	-31.0	-0.3	2.3
F_1	$ef-fff-ef$	$R_{23} B_{2122} R_{122} R_{312} R_{222} B_{31} R R_{11}$	8.0	-35.9	2.4	3.8

^a В $U_{\text{нв}}$ включена также энергия водородных связей.

Характерная особенность всех теоретических исследований пространственного строения ангиотензина II^{26, 80–83} — отсутствие какой-либо классификации конформационных состояний молекулы, не говоря уже о такой, которая была бы обоснована с физической точки зрения и охватывала все возможные структурные варианты, систематизированные в соответствии с субординационными взаимоотношениями по таксонометрическим категориям. Все оценки оптимальных конформаций в обсуждаемых работах выполнены на основе относительных величин общей энергии, без количественного анализа вкладов от отдельных внутри- и межостаточных взаимодействий в структурных вариантах всевозможных форм различных типов основной цепи. Поэтому результаты расчетов^{26, 80–83} не гарантированы ни от случайных пропусков, ни от неправильных оценок полученных данных. Подтверждением такому заключению является табл. 3.

Таким образом, имеющиеся конформационные данные по ангиотензину II нельзя было использовать для опробывания подхода «от структуры к функции». Это обстоятельство побудило автора и Гогитидзе предпринять собственный анализ конформационных состояний этой молекулы.⁸⁴ Ниже

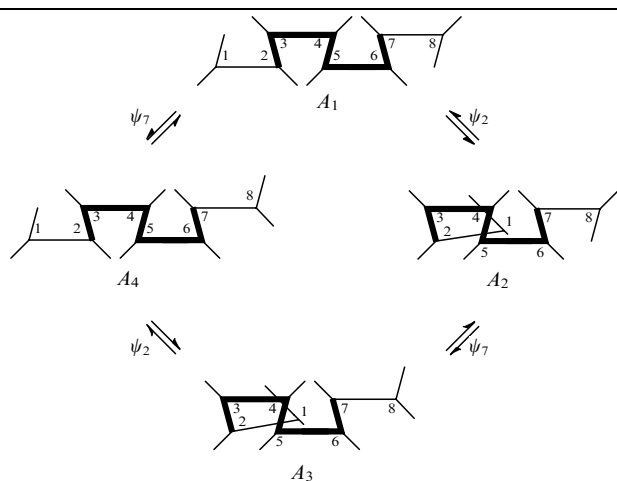


Рис. 2. Шейпы пептидного скелета и пути взаимных переходов низкоэнергетических конформаций группы A (табл. 4)

кратко рассмотрен метод расчета, обозначения и полученные результаты.

Структурная организация молекулы ангиотензина II исследована на основе развитых в работах^{2, 85} конформационной теории и соответствующего расчетного метода в предположении жесткой валентной схемы, представленной на рис. 1. Конформационные возможности октапептидного гормона определяются 41 значением двугранных углов вращения вокруг связей основной цепи (φ, ψ, ω) и боковых цепей ($\chi^1, \chi^2, \dots$). Используемые в расчете потенциальные функции и полуэмпирические параметры для оценки невалентных, электростатических, торсионных взаимодействий и водородных связей указаны в работах^{86, 87}. В расчете и при изложении результатов использована предложенная в сообщениях^{2, 85, 87} естественная классификация пептидных структур по трем уровням пространственной организации: конформации, форме и шейпу основной цепи.

Для обозначения конформации применена система идентификаторов, согласно которой конформационное состояние каждого остатка определяется через X_{ij}^n , где X характеризует форму основной цепи остатка (R, B, L и P), n — номер остатка в последовательности, а символы $ij = 11, 12, 13, 21$ и т.д. отвечают положениям боковой цепи ($\chi^1, \chi^2, \dots$); индекс 1 соответствует значениям углов в области от 0 до 120, 2 — от 120 до -120 , а 3 — от -120 до 0° . Кроме формы, основная цепь характеризуется еще шейпом, или структурным типом, описываемым сочетанием символов f и e , которые обозначают соответственно свернутую и развернутую конфигурацию виртуальных связей $C^\alpha - C_i^\alpha - C_{i+1}^\alpha - C_{i+2}^\alpha$. Количественно конфигурация определяется виртуальным углом вращения вокруг связи $C_i^\alpha - C_{i+1}^\alpha$, $\theta = \psi_i + \phi_{i+1}$. Обозначения и отсчеты углов вращения соответствуют общепринятой номенклатуре.⁸⁸

Конформационный анализ октапептидного гормона проводился в три этапа. Первый включал в себя независимый расчет пяти конформаций, перекрывающихся по трем ами-

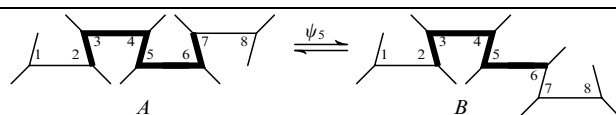


Рис. 3. Взаимный переход конформаций групп A и B (табл. 4)

Таблица 5. Значения двугранных углов вращения (в град.) в конформациях A_1 и B_1 (в скобках) молекулы ангиотензина II

Остаток	Основная цепь			Боковая цепь			
	ϕ	ψ	ω	χ^1	χ^2	χ^3	χ^4
Asp ¹	–1 (–50)	–60 (–60)	–178 (180)	80 (178)	–92 (–93)	– (–)	– (–)
Arg ²	–151 (–86)	160 (–35)	179 (–176)	61 (–60)	–179 (–178)	64 (180)	–179 (180)
Val ³	–97 (–97)	–60 (–61)	179 (–177)	178 (179)	–179 (–180)	–179 (–180)	– (–)
Tyr ⁴	–90 (–91)	146 (44)	–169 (–476)	170 (–175)	61 (90)	180 (180)	– (–)
Val ⁵	61 (–99)	–38 (105)	175 (177)	70 (180)	179 (–179)	–175 (180)	– (–)
His ⁶	–85 (–122)	126 (153)	174 (174)	–60 (59)	102 (92)	– (–)	– (–)
Pro ⁷	–60 (–60)	–31 (124)	179 (–178)	180 (180)	180 (180)	180 (180)	– (–)
Phe ⁸	–95 (–96)	–38 (121)	– (–)	60 (–60)	86 (92)	– (–)	– (–)

нокислотным остаткам тетрапептидных фрагментов, второй этап заключался в расчете гексапептидного фрагмента Asp¹–His⁶, а третий — в расчете всей молекулы ангиотензина.

В табл. 4 представлены конформации гормона с относительной энергией от 0 до 8.0 ккал·моль^{–1}. Первые четыре структуры с $\Delta U = 0 \div 4$ ккал·моль^{–1} составляют группу A . Для них характерна жесткая нуклеация типа *fef* центрального участка молекулы при относительной подвижности N- и C-концевых дипептидных фрагментов. На рис. 2 показаны шейки пептидных скелетов этих структур и пути их взаим-

ной конверсии. Все изменения конформационных состояний основной цепи ангиотензина в пределах группы A , отвечающие низкоэнергетическим переходам $R \rightarrow B$, осуществляются через вращения вокруг связи $C^\alpha-C'$ остатка Arg² или Pro⁷ путем изменения соответствующего угла ψ на 180°.

Следующие шесть конформаций с относительно невысокой энергией ($\Delta U = 3.5 \div 7.0$ ккал·моль^{–1}), объединенные в группу B , также имеют одинаковую структуру центрального участка Val³–Pro⁷. Она принадлежит шейке *fee* и отличается от структуры этого участка в предшествующих конформациях состоянием лишь одного остатка (Val⁵). Переход между представителями групп A и B низкоэнергетичен и сводится к изменению двугранного угла ψ_5 (рис. 3). При этом боковая цепь остатка His удаляется от фенольного кольца боковой цепи остатка Tyr, что приводит к небольшой (~ 1.0 ккал·моль^{–1}) дестабилизации конформаций группы B относительно A . Шейки шести низкоэнергетических конформаций группы B и пути перехода их друг в друга показаны на рис. 4.

Лучшие конформации групп C , D , E и F (табл. 4) заметно уступают по энергии конформациям групп A и B . Они менее компактны и проигрывают прежде всего по энергии невалентных взаимодействий. Следующие представители этих групп имеют энергию, превышающую 10 ккал·моль^{–1}.

Итак, спектр энергетического распределения оптимальных конформаций ангиотензина II состоит из нескольких основных уровней (A , B , C , ...), определяемых конформационными состояниями центрального фрагмента Val³–His⁶, и сравнительно небольшого числа подуровней, различающихся конформационными состояниями лабильных N- и C-концевых дипептидов; первый может принимать пространственные формы всех возможных типов (*ee*, *ef*, *fe*, *ff*), а второй — только двух (*ee*, *ef*). Распределение конформаций в каждом семействе по энергии в наибольшей мере зависит от числа и эффективности стабилизирующих контактов между остатками лабильных и жестких фрагментов.

Из сопоставления представленных в табл. 4 энергетических вкладов от невалентных, электростатических и торсионных взаимодействий в низкоэнергетические конформации молекулы ангиотензина следует, что решающее значение в стабилизации пространственной структуры имеют невалентные, главным образом дисперсионные взаимодействия или, иными словами, плотность упаковки аминокислотной последовательности. Между величинами U и $U_{\text{нв}}$ четкой корреля-

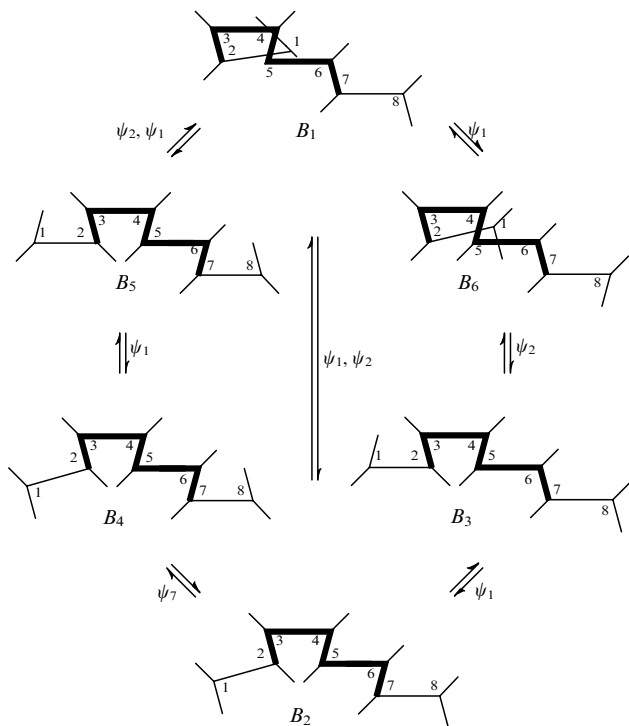


Рис. 4. Шейки пептидного скелета и пути взаимных переходов низкоэнергетических конформаций группы B (табл. 4)

ции нет, хотя тенденции в их изменении аналогичны. Конформации группы *A* в среднем компактнее конформаций группы *B* ($U_{\text{нв}}A = -38.6$, а $U_{\text{нв}}B = -36.4$ ккал·моль⁻¹) и тем более *C* и *D*. Геометрия и энергия фрагмента Val³—His⁶ практически постоянны в конформациях каждой группы.

Таким образом, общий результат решения прямой структурной задачи для ангиотензина II может быть сведен к утверждению, что структурная организация молекулы описывается сравнительно немногочисленным набором низкоэнергетических, легко переходящих друг в друга конформационных состояний, подразделяющихся на несколько семейств. Энергетически и энтропийно наиболее предпочтительны состояния семейств *A* и *B*. Геометрические параметры их лучших представителей (*A*₁, *B*₁; табл. 4) приведены в табл. 5.

V. Синтетические аналоги ангиотензина

Исследование конформационных возможностей ангиотензина II⁸⁴ позволило выявить структурную организацию гормона и тем самым определить набор низкоэнергетических пространственных форм, потенциально являющихся биологически активными. Решение следующей задачи, касающейся структурно-функциональной организации ангиотензина II, заключается в выявлении в найденном наборе структур, актуальных для реализации физиологических действий, и в установлении конкретных связей между этими структурами и функциями. Развитие исследований в этом направлении требует обращения к экспериментальным данным о функциональных особенностях ангиотензина II. Производимый ангиотензином II эффект в организме млекопитающих является суммой разнообразных откликов, характер которых зависит от органов и тканей, подвергающихся действию гормона (см. табл. 2). Имеющийся экспериментальный материал свидетельствует о том, что ангиотензин II, как и большинство других пептидных гормонов, полифункционален.

Большое количество полученных в последние годы экспериментальных данных свидетельствует в пользу гетерогенности рецепторов ангиотензина II. Детально этот вопрос будет рассмотрен позже, сейчас лишь отметим, что полифункциональность ангиотензина II и гетерогенность его рецепторов естественным образом можно связать с молекулярной структурной организацией гормона, изученной теоретически. Его предрасположенность к реализации ряда функций проявляется в существовании в физиологических условиях нескольких близких по энергии и легко переходящих друг в друга пространственных форм. Высокая эффективность и строгая избирательность взаимодействий ангиотензина II с различными рецепторами связаны с тем, что каждая его функция реализуется посредством актуальной только для данного рецептора конформации из состава предпочтительных структур свободной молекулы.

Таким образом, поиск структурно-функциональной организации ангиотензина II сводится к выяснению для каждого биологического действия пептида актуальной конформации. Решение этой задачи при отсутствии необходимых данных о потенциальных поверхностях мест связывания требует привлечения дополнительной информации. В качестве такой информации, как правило, используются данные по биологической активности синтетических аналогов природных пептидов. Однако при формировании серии аналогов случайным образом, без предварительного изучения конформационных возможностей как природного пептида, так и его искусственных аналогов, в ходе исследования, по существу, ищется прямая зависимость между отдельными остатками аминокислотной последовательности гормона и его функциями. Поскольку стимулированные гормоном аллостерические эффекты возникают в результате не точечных, а множественных контактов между комплементарными друг другу

потенциальными поверхностями лиганда и рецептора (иначе отсутствовала бы избирательность гормональных действий), нарушение функции при замене даже одного остатка может быть следствием целого ряда причин: исчезновения нужной функциональной группы, потери необходимых динамических свойств актуальной конформации, запрещения последней из-за возникающих при замене остатка стерических напряжений, смещения конформационного равновесия из-за изменившихся условий взаимодействия с окружением и т.д.

Следовательно, случайная замена отдельных остатков не позволяет решить задачу о структурно-функциональной организации гормонов. Об этом говорит отсутствие в течение нескольких десятков лет заметного прогресса в ведущихся с привлечением множества искусственных аналогов исследованиях зависимости между структурой и функцией ангиотензина II, энкефалинов и эндорфинов, нейрогипофизарных гормонов и брадикининпотенцирующих пептидов, а также ряда других. Все это свидетельствует о необходимости привлечения к исследованию структурно-функциональных соотношений у пептидных гормонов специального подхода, который позволил бы отойти от метода проб и ошибок и при поиске синтетических аналогов делать сознательный выбор до их синтеза и биологических испытаний.

Рассмотрим в этой связи работу Никифоровича и соавт.,⁸¹ в которой предпринята попытка идентифицировать биологически активные конформационные состояния ангиотензина II, используя наряду с опытными данными результаты теоретического анализа. Предполагаются известными конформации молекулы гормона и двух его аналогов (конформации *A*₁, *A*₂, ..., *A*_{*n*}), имеющих высокое сродство к определенному рецептору, и конформации *B*₁, *B*₂, ..., *B*_{*n*}, являющихся неактивными. Авторы полагают, что конформации, присутствующие в наборах низкоэнергетических состояний гормона и аналогов *A*₁, *A*₂, ..., *A*_{*n*} и отсутствующие в наборах *B*₁, *B*₂, ..., *B*_{*n*}, относятся к биологически активным структурам ангиотензина II.

При реализации такого подхода были использованы три синтетических аналога ангиотензина II, имеющих высокое сродство, и один, не обладающий сродством к рецептору гладкомышечной ткани крысы. Расчет,⁸¹ однако, показал, что среди найденных конформаций ангиотензина II и трех его активных аналогов нет таких, которые хотя бы фрагментарно совпадали. Отсутствие совпадения, скорее всего, свидетельствовало о некорректности анализа ангиотензина II и его аналогов. Однако авторы работы⁸¹, не ставя под сомнение результаты своих расчетов, сделали, с нашей точки зрения, принципиально неверный шаг. Они отказались от принципа комплементарности потенциальных поверхностей гормона и рецептора и посчитали, что для образования продуктивного комплекса достаточно точечного соответствия. Для отбора конформаций ими были учтены всего два расстояния (причем с вариациями в очень широких интервалах) между атомом C^α остатка Val³ и атомами C^α остатков His⁶ (4.2–6.2 Å) и Pro⁷ (6.7–8.2 Å).

Выбранный критерий крайне неэффективен, так как ему, вообще говоря, могут удовлетворять десятки совершенно различных структур ангиотензина II, различающихся как формой основной цепи, так и ориентациями боковых цепей. В указанные интервалы межатомных расстояний попадает, в частности, одна из наиболее предпочтительных конформаций рассчитанного нами⁸⁹ и обсуждаемого ниже [Pro²]-ангиотензина II — аналога, сродство которого к рецепторам гладкомышечной ткани составляет всего 0.7% сродства природного пептида.

Но дело не только в выборе более надежного критерия отбора конформаций. Задача осталась бы нерешенной даже и в том случае, если бы была обнаружена общность в наборах низкоэнергетических конформационных состояний ангиотензина II и его активных аналогов, что непременно должно было бы наблюдаться при правильном решении прямой

структурной задачи. Привлечение теоретического конформационного анализа в отсутствие информации о рецепторах и при случайном выборе аналогов не решает задачу структурно-функциональной организации природного пептида.

В условиях полифункциональности ангиотензина II и гетерогенности его рецепторов связи между низкоэнергетическими конформациями и функциями гормона могут быть установлены с помощью весьма немногочисленной серии синтетических аналогов лишь в том случае, если каждое соединение этой серии будет принимать только одно состояние из набора предпочтительных конформаций природного пептида. Тогда все аналоги будут иметь возможность реализовать только по одной гормональной функции, или, точнее, воспроизвести взаимодействие гормона только с одним рецептором. При монофункциональности аналогов их совокупность сможет передать весь спектр биологических действий природного пептида. Возникающая в этом случае задача заключается в теоретическом определении характера химических модификаций аминокислотной последовательности гормона, которые необходимы для выделения той или иной актуальной для соответствующей функции природного пептида конформации и запрещения других (обратная структурная задача). Иными словами, речь идет о целенаправленном конструировании химического строения искусственных аналогов, каждый из которых заведомо принимает пространственное строение, необходимое для реализации вполне определенной функции.

Ранее автором был предложен метод решения обратной структурной задачи.¹ Он основан на количественной конформационной теории природных пептидов и белков,² в частности на оценке особой роли ближних (внутриостаточных) невалентных взаимодействий атомов в пространственной организации природных аминокислотных последовательностей и использовании естественной классификации пептидных структур на шейки, формы и конформации.² Ближние взаимодействия обладают чрезвычайно важным для решения обратной структурной задачи свойством — полностью определять исходные наборы дозволённых конформационных состояний остатков. При свертывании пептидной цепи только из этих наборов происходит выбор конформационного состояния каждого остатка. Поэтому, влияя контролируемым образом на изменения ближних взаимодействий, можно сознательно формировать наборы конформационных состояний остатков и тем самым эффективно и целенаправленно воздействовать на пространственную организацию пептида. Как было показано,¹ добиться этого можно теми же сравнительно простыми средствами, которые работала сама природа в процессе эволюции органического мира: это замена в последовательности одного стандартного остатка на другой, существенно отличающийся по своим конформационным возможностям (например, Gly на Ala или Pro), химическая модификация стандартного остатка (*N*-метилирование, замена L-аминокислоты на D-изомер и т.д.), замена аминокислоты на гидроксикислоту. Можно также поменять остатки Cys на Ala и тем самым исключить образование дисульфидных связей, не внося стерических осложнений, или, напротив, заменить пространственно сближенные остатки на Cys и способствовать созданию макроциклов, скрепленных S—S-мостиками. Таким образом, имеется много возможностей целенаправленного конструирования набора искусственных аналогов гормона.

Рассмотрим результаты решения обратной структурной задачи для ангиотензина II.⁸⁹ В табл. 6 сопоставлены величины относительной энергии взаимодействий валентно не связанных атомов в предпочтительных конформациях самого гормона и в родственных им низкоэнергетических конформациях ряда его природных и синтетических аналогов. Напомним, что главная цель исследования⁸⁹ заключалась в апробации концепции гетерогенности ангиотензиновых рецепторов и в идентификации на основе предложен-

ного в работе¹ подхода конформаций гормона, ответственных за определенные функции. Исходными явились, с одной стороны, аминокислотная последовательность гормона и, следовательно, его конформационные возможности, а с другой — спектр биологического действия гормона и количественные оценки активности каждой функции. После определения минимально необходимого набора синтетических аналогов для каждого из них нужны столь же исчерпывающие биологические испытания этих аналогов. Поэтому приходилось опираться на имеющийся в литературе экспериментальный материал. Хотя для ангиотензина II он наиболее обширен, тем не менее и здесь ощущается острый недостаток опытных фактов, касающихся биологических испытаний синтетических аналогов. Последние, как правило, тестируются лишь по одной функции, а поэтому остаются неизвестными очень важные в данном случае полные спектры их биологических активностей. Наличие таких сведений позволило бы значительно расширить результаты нашего исследования.

Решение обратной структурной задачи для ангиотензина II строится на основе известного из работы⁸⁴ набора предпочтительных по энергии конформаций природной молекулы. Расчет показал, что структурная организация октапептидного гормона может быть представлена ограниченным числом низкоэнергетических конформаций, которые в зависимости от геометрии центрального тетрапептидного фрагмента Val³—His⁶ распадаются на две группы — *A* и *B* (см. табл. 6). В каждой группе конформации отличаются друг от друга состояниями N- и C-концевых дипептидов и в свою очередь могут быть разделены на структуры со свободной боковой цепью остатка Asp или Arg.

В организмах млекопитающих ангиотензин II встречается в двух разновидностях, различающихся природой остатка в первом положении (Asp или Asn), что слабо сказывается на функциональных спектрах и физиологической активности обоих гормонов. Из табл. 6 видно, что конформационные возможности природного аналога [Asn¹]-AT II весьма схожи с конформационными возможностями AT II с остатком Asp¹ в первом положении. Заслуживает внимания лишь смена глобальной конформации в группе *A*. В молекуле AT II наименьшую энергию имеет конформация *A*₁. В ее стабилизацию существенный вклад вносит остаток Arg², гидрофобная часть боковой цепи которого осуществляет эффективные дисперсионные взаимодействия почти со всеми остатками фрагмента Val³—Pro⁷ (−11.5 ккал·моль^{−1}), а гуанидиновая группа, несущая целочисленный положительный заряд, взаимодействует также и с C-концевым остатком Phe⁸, заряженным отрицательно (−2.9 ккал·моль^{−1}). Остаток аспарагиновой кислоты практически не взаимодействует с остальной частью молекулы и ориентирован в окружающую среду. В конформации *A*₂, энергия которой (0.9 ккал·моль^{−1}) лишь незначительно превышает энергию *A*₁, ситуация меняется: свободной оказывается боковая цепь остатка Arg², а связанной — Asp¹.

В молекуле [Asn¹]-AT II, в отличие от AT II отсутствует отрицательный заряд у первого остатка, и поэтому резко ослабляется стабилизирующая энергия его электростатического взаимодействия с остатком Arg². Это и служит причиной меньшей предпочтительности конформации *A*₁ по сравнению с *A*₂, которая и становится наиболее выгодной.

К интересному результату, хорошо коррелирующему (в чем можно будет убедиться ниже) с физиологической активностью, привел расчет ангиотензина III, отличающегося от ангиотензина II отсутствием в последовательности первого остатка. Удаление Asp¹ существенно изменяет положение конформационного равновесия $A \rightleftharpoons B$, смещая его вправо. Наиболее выгодной становится конформация *B*₄ или *B*₅, что абсолютно одно и то же, а лучшая у ангиотензина II конформация *A*₁ приобретает высокую относительную энергию (7.4 ккал·моль^{−1}; табл. 6) и становится малореальной.

Таблица 6. Относительная энергия низкоэнергетических конформаций природных ангиотензинов (АТ) и синтетических аналогов ангиотензина II

Группа и номер кон- формации	Шейп	Относительная энергия конформаций (ΔU , ккал · моль ⁻¹)														
		АТ II	[Asn ¹]- АТ II	АТ III	АТ I	АТ II – (1–6)-пептид	[Pro ³]- АТ II	[Pro ⁵]- АТ II	[Ala ³]- АТ II	[Ala ⁵]- АТ II	[Pro ²]- АТ II	[Ala ⁸]- АТ II	[Leu ⁸]- АТ II	[Val ⁸]- АТ II	[Ile ⁸]- АТ II	[Tyr ⁸]- АТ II
A ₁	fe	0	4.4	7.4	0.8	2.6	0	0	0	0	—	0	0	0	1.3	0
A ₂	ff	0.9	0	1.2	0	2.8	—	0	0.6	0.9	—	1.3	2.0	2.3	4.0	0
A ₃	ff	3.5	3.4	5.1	7.9	2.8	—	8.8	2.7	4.6	—	4.7	1.5	4.9	0	3.8
A ₄	fe	4.0	8.5	7.3	3.0	2.6	4.5	1.8	3.5	4.8	—	3.4	0.3	5.0	0.2	3.6
B ₁	ff	3.5	5.3	4.1	9.9	3.6	—	6.4	4.3	4.9	—	6.2	4.6	5.4	1.3	3.0
B ₂	ee	3.7	2.5	1.8	9.6	0	—	6.5	5.8	7.4	4.6	6.5	5.7	7.4	5.1	3.8
B ₃	fe	4.4	2.6	1.8	—	0.8	—	—	3.8	5.5	—	5.7	2.8	6.2	3.7	5.5
B ₄	ee	4.6	2.7	0	7.5	0	—	—	5.8	7.4	9.5	6.5	6.3	4.9	7.9	6.2
B ₅	fe	6.0	3.2	0	8.3	0.8	—	—	5.4	7.0	—	5.8	4.9	2.78	6.0	8.9
B ₆	ef	7.0	8.0	4.1	—	5.6	—	6.5	7.5	7.4	0	9.3	6.1	5.7	5.4	7.7
C ₁	ff-efe-ee	7.5	—	9.5	—	5.8	—	—	10.0	7.5	—	7.6	4.1	3.7	4.2	7.1
D ₁	ff-eee-ee	7.8	9.8	5.3	5.4	2.7	—	—	8.8	9.0	—	8.0	9.1	2.6	—	7.0
E ₁	fe-fff-ef	7.8	—	9.0	—	5.6	—	7.4	7.3	7.7	—	8.2	4.5	3.8	4.0	7.3
F ₁	ef-ef-ef	8.0	4.8	4.0	7.6	5.1	—	—	7.9	7.8	0.8	8.0	8.9	5.5	5.0	7.6

Примечание. Прочерк означает, что энергия конформации превышает 10 ккал · моль⁻¹.

Одна из причин повышения энергии конформации A_1 по сравнению с B_4 связана с большей величиной дестабилизирующей электростатической энергии взаимодействий положительных зарядов, принадлежащих основной и боковой цепям остатка Arg^2 , у конформации A_1 энергия невалентных взаимодействий остатка аргинина составляет $+14.0 \text{ ккал} \cdot \text{моль}^{-1}$, а у B_4 — $+9.0 \text{ ккал} \cdot \text{моль}^{-1}$. Вторая причина смещения конформационного равновесия при отсутствии в последовательности ангиотензина N-концевого остатка Asp^1 заключается в более компактной упаковке и, следовательно, в меньшей энергии дисперсионных межостаточных взаимодействий валентно не связанных атомов боковой цепи Arg^2 в конформации B_4 ($-22.1 \text{ ккал} \cdot \text{моль}^{-1}$), чем в A_1 ($-17.6 \text{ ккал} \cdot \text{моль}^{-1}$).

Ангиотензин I (табл. 6) — декапептид, содержащий в C-концевой части последовательности остатки His и Leu . Увеличение длины цепи заметно повлияло на распределение конформаций по энергии. Оно привело к большей детерминации конформационных состояний пептида, т.е. к ограничению конформационной свободы. Из структурного набора ангиотензина II разрешенными фактически остаются три конформации группы A (A_1 , A_2 и A_4), причем самыми низкоэнергетическими по-прежнему являются A_1 и A_2 . Конформация A_2 более выгодна по энергии, чем A_1 , так как ее потенциальная поверхность более комплементарна поверхности дополнительного дипептидного фрагмента $\text{His}^9\text{—Leu}^{10}$. Заметное повышение у ангиотензина I энергии конформаций группы B , делающее их практически запрещенными, объясняется, во-первых, значительно более слабыми взаимодействиями участка $\text{His}^9\text{—Leu}^{10}$ с остальной частью молекулы (их энергия, например у B_1 составляет $-6.2 \text{ ккал} \cdot \text{моль}^{-1}$, в то время как у A_2 и A_1 соответственно -11.3 и $-9.4 \text{ ккал} \cdot \text{моль}^{-1}$), а во-вторых, потерей по стерическим причинам ряда стабилизирующих взаимодействий остатка Phe^8 , концевого у ангиотензина II и промежуточного у ангиотензина I.

Если удлинение пептидной цепи на два остатка (AT I) понижает относительную энергию конформаций группы A , то укорочение на два остатка цепи по сравнению с ангиотензином II (AT II-(1–6)-пептид) действует в противоположную сторону: две из четырех конформаций группы B обретают самую низкую энергию, не превышающую $1.0 \text{ ккал} \cdot \text{моль}^{-1}$. Изменения, однако, не так резки, как в случае AT I, и конформационные возможности гексапептидного аналога ангиотензина, лишенного с потерей двух остатков ряда стабилизирующих взаимодействий, естественно, возрастают. Реальными при определенных внешних условиях становятся не только конформации группы A , но даже $C_1\text{—}F_1$, и особенно D_1 .

Замена в молекуле ангиотензина II остатков валина в третьем и пятом положениях на остатки пролина ([Pro^3]-AT II и [Pro^5]-AT II; табл. 6) и аланина ([Ala^3]-AT II и [Ala^5]-AT II) преследовала цель внести определенные, причем заранее известные, стерические затруднения и запретить реализацию большого числа конформаций (первые два пептида) и, напротив, сделать аминокислотную последовательность ангиотензина II более лабильной и оценить ограничительный эффект на формирование пространственного строения молекулы достаточно объемных и разветвленных при атоме C^α остатков валина (вторая пара пептидов).

Предшествующий пролину остаток, находясь в R -форме, имеет высокую энергию из-за перекрывания ван-дер-ваальных радиусов атомов водорода собственной метиленовой группы пролинового цикла. Для этого остатка наиболее предпочтительна форма B , а затем L . Поэтому дипептидный участок $\text{Arg}^2\text{—Pro}^3$ у аналога [Pro^3]-ангиотензина II может обладать только развернутым шейпом e . Следовательно, реализация шести из 14 возможных низкоэнергетических конформаций ангиотензина II с R -формой Arg^2 и f -шейпом дипептида $\text{Arg}^2\text{—Pro}^3$ становится у синтетического аналога

маловероятной. Предпочтительными остаются лишь структуры A_1 и A_4 с относительной энергией 0 и $4.5 \text{ ккал} \cdot \text{моль}^{-1}$. Энергия остальных структур превышает $10.0 \text{ ккал} \cdot \text{моль}^{-1}$.

При замене Val^5 на Pro^5 не запрещаются конформации ни в группе A , ни в группе B , так как и там и там участок $\text{Tyr}^4\text{—Val}^5$ имеет развернутую форму. Тем не менее расчет показал, что ситуация здесь в принципе аналогична только что рассмотренной, т.е. наблюдается понижение относительной энергии конформаций A и повышение относительной энергии конформаций B .

Замена Val^3 и Val^5 на аланин, предоставляющая, казалось бы, большую конформационную свободу основной цепи гормона в пределах тех же минимумов многомерной потенциальной поверхности, как показал расчет, практически не повлияла на положение конформационного равновесия. По-прежнему структуры группы A в полярной среде предпочтительнее B , а структуры $C_1\text{—}F_1$ столь же высокоэнергетичны. Поэтому можно ожидать, что спектр физиологической активности аланиновых аналогов в отличие от пролиновых будет достаточно полно воспроизводить спектр природного ангиотензина II.

В [Pro^3]-AT II замена касается остатка, не только диктующего чисто стерические условия формирования конформационных состояний молекулы, как у рассматриваемых выше четырех синтетических аналогов природного гормона, но и, безусловно, играющего весьма важную роль в специфическом узнавании или в последствиих гормон-рецепторных взаимодействий. Такая двойственность несколько осложняет трактовку результатов теоретического конформационного анализа этого аналога (см. табл. 6). Любопытно, что у [Pro^2]-AT II самыми предпочтительными являются конформации — B_6 и F_1 , имеющие очень высокую энергию у ангиотензина II.

Рассмотрим еще пять аналогов ангиотензина II. Остаток Phe ангиотензина II последовательно заменен на остатки Ala , Leu , Val , Ile и, наконец, Tyr , т.е. на гидрофобные остатки постепенно увеличивающегося объема. Каких-либо существенных изменений в наборе предпочтительных по энергии конформаций по сравнению с природным октапептидом при этом не наблюдается. Во всех случаях доминируют структуры группы A . Энергетическое распределение конформаций [Tyr^8]-AT II практически совпадает, как и можно было ожидать, с распределением в ангиотензине II.

Выбор для расчета всех аналогов ангиотензина II, представленных в табл. 6, особенно последних шести, обусловлен наличием соответствующего экспериментального материала, который анализируется в следующем разделе в свете изложенных результатов конформационного анализа.

VI. Полифункциональность гормона и гетерогенность рецепторов

Знание количественных характеристик структурной организации ангиотензина II и его аналогов — необходимое условие последующего изучения структурно-функциональной организации гормона. Однако этого еще далеко не достаточно. Переход к выявлению физиологических особенностей ангиотензина II, как и любого другого природного олигопептида, сталкивается с трудностями принципиального характера, возникающими из-за незнания причин полифункциональности пептидных гормонов. Отсутствие ясности в этом вопросе обусловлено крайне скудной информацией о гормональных рецепторах. Иными словами, задачу о структурно-функциональной организации гормона приходится решать, по существу, не располагая сведениями о свойствах его партнеров по взаимодействиям.

Существуют две точки зрения на причину полифункциональности ангиотензина и других пептидных гормонов. Согласно одной из них,⁹⁰ способность того или иного гормона стимулировать совершенно различные процессы в

разных частях организма объясняется наличием нескольких специфических для данного гормона рецепторных белков, т.е. гетерогенностью рецепторов. Такой точке зрения не противоречит известная структурная организация молекул гормонов. Природные олигопептиды в нативном состоянии представляют собой не строго детерминированные трехмерные структуры, как в случае высокомолекулярных белков, а наборы сравнительно немногочисленных пространственных форм с легко изменяющимся под действием внешних сил положением конформационного равновесия.² С таким допущением хорошо согласуются результаты проведенных ранее исследований конформационных возможностей брадикинин-потенцирующих пептидов³⁹ и нейрогипофизарных гормонов — окситоцина, вазопрессина, вазотоцина и мезотоцина.^{27, 91}

Иная трактовка этого явления исходит из того, что каждый гормон способен образовывать продуктивный комплекс только с одним рецептором, и, следовательно, вызывать всегда одно и то же аллостерическое изменение его конформации. Если рецепторы одинаковы, то полифункциональность гормона определяется уже не спецификой самих гормон-рецепторных взаимодействий, а особенностями систем, воспринимающих посылаемый сигнал. В этом случае многообразие физиологических действий гормона обусловлено не уникальной структурой его молекулы и особенностями взаимодействий с рецепторными белками, а специфической структурной организацией тех систем, которые по-разному откликаются на один и тот же сигнал, идущий от взаимодействующих с ними одинаковых гормон-рецепторных комплексов.

Предположение о гетерогенности гормональных рецепторов, в частности рецепторов ангиотензина II, подтверждается результатами исследований, проведенных в последние годы. Так, на это указывают и различный характер взаимодействия аналогов ангиотензина II с рецепторами разных тканей (например, наличие нескольких аналогов с селективным действием),^{92–95} и неодинаковое воздействие катионов на связывание самого гормона с рецепторами тканей различных органов,⁹⁵ и обнаружение значительно различающихся по молекулярной массе рецепторов гормона в тканях печени кролика,⁹⁶ плаценты человека,⁹⁷ коры надпочечников крысы и собаки.⁹⁸

Однако наиболее существенный довод в пользу гетерогенности рецепторов как причине полифункциональности ангиотензина II был получен недавно при использовании непептидных антагонистов гормона.^{90, 99} Изучение нового класса непептидных антагонистов к исследованию рецепторов ангиотензина II позволило выявить наличие различных типов специфических рецепторов ангиотензина II в организме млекопитающих. Так, в одной из работ этой серии⁹⁹ к идентификации рецепторов в ткани коры надпочечников крысы были привлечены два сложных органических соединения, обозначенных авторами DUP-89 и WL-19. Оказалось, что каждое из них может связываться с рецептором только вполне определенного вида, в то время как ангиотензин II проявляет высокое сродство к обоим рецепторам. В результате было показано, что даже в одной ткани у гормона имеются два рецептора, по-разному представленных в клетках этой ткани. Позднее рецептор, имеющий повышенное сродство к антагонисту WL-19, был обнаружен в матке крысы и человека и в мозгу крысы.¹⁰ Использование других непептидных антагонистов позволило также выделить различные типы рецепторов ангиотензина II в тканях печени и сосудов мозга крысы.^{100, 101}

Итак, целый ряд опытных данных убедительно свидетельствует о существовании у ангиотензина II набора рецепторов, представляющих различные конформационные требования к гормону. Одна из задач развиваемого нами подхода «от структуры к функции» применительно к конкретному объекту как раз и заключается в установлении количествен-

ной взаимосвязи между имеющимся экспериментальным материалом и структурной организацией молекулы ангиотензина II и тем самым в более строгом обосновании трактовки полифункциональности пептидных гормонов гетерогенностью рецепторов.

Если наше предположение справедливо и вполне определенная конформация из найденного в работе⁸⁴ для ангиотензина набора низкоэнергетических, легко переходящих друг в друга пространственных форм действительно осуществляет взаимодействие только с одним рецептором и, следовательно, ответственна за реализацию только одной функции, то следующая задача заключается в определении для каждого физиологического действия гормона актуального лишь для него, т.е. комплементарного соответствующему рецептору, конформационного состояния. Таким образом, требуется соотнести известные из теоретического анализа предпочтительные по энергии конформации с полученными экспериментально функциями. Поскольку структуры рецепторов, а тем более их активных центров неизвестны, эту задачу, как уже отмечалось, нельзя решить не привлекая дополнительную информацию. Такая информация может быть получена при изучении синтетических аналогов гормона.

Синтетические аналоги используются в эндокринологии уже в течение многих десятилетий. Однако полученные с их помощью результаты, несмотря на затрату огромных усилий и средств, свидетельствуют о малой эффективности такого подхода, особенно в научном, познавательном отношении. Мы полагаем, что дело не в самом подходе (в настоящее время альтернативы ему нет), а в неудовлетворительном использовании его потенциальных возможностей.

Практически всем работам этого направления присущи три серьезные недостатка. Первый, и самый существенный, обусловлен случайностью выбора искусственных аналогов. Второй слабый момент, также не позволяющий исследованиям такого рода подняться выше эмпирического уровня, заключается в игнорировании возможностей теоретического анализа конформационных состояний как самого гормона, так и выбранных синтетических аналогов. Наконец третий, характерный для исследований в этой области недостаток состоит в отсутствии не только общего теоретического базиса, но и единого системного подхода к экспериментальному изучению гормонов. Несмотря на множество работ в этой области, все еще не представляется возможным хотя бы в одном случае сопоставить активности гормона с активностями синтетических аналогов по всему функциональному спектру. Как правило, при изучении биологических действий природного пептида каждый раз используются разные источники, разные ткани и, что наиболее существенно, разные наборы аналогов.

При полифункциональности пептидных гормонов, гетерогенности рецепторов и отсутствии информации о строении последних самая главная, узловая проблема, попытаться решить которую можно только с помощью соответствующих теоретических разработок, заключается в переходе от случайного, чисто интуитивного поиска синтетических аналогов методом проб и ошибок к их целенаправленному, отвечающему специальным требованиям выбору. Чтобы быть полезным в изучении зависимости между структурой и функциями гормона, каждый его синтетический аналог должен быть по возможности монофункциональным, т.е. выполнять одну из функций природного пептида и, следовательно, обладать способностью принимать из набора его актуальных низкоэнергетических конформаций только одну пространственную форму, комплементарную активному центру соответствующего рецептора. Более общая цель состоит в целенаправленном конструировании химической структуры молекулы, заведомо принимающей такое пространственное строение, которое необходимо для реализации планируемой вполне определенной функции.

Вернемся теперь к объекту нашего рассмотрения — ангиотензину II, для которого уже были решены прямая и обратная структурные задачи (гл. IV, V).^{84, 89} При последующем изучении гормона¹⁰² пришлось, однако, несколько отступить от порядка работы, диктуемого строгой логикой. Вынужденное отступление, хотя и не принципиально, тем не менее не ведет к полному раскрытию возможностей подхода «от структуры к функции». Оно вызвано отсутствием в литературе необходимого экспериментального материала, хотя ангиотензин II и является одним из наиболее полно изученных пептидов. Известные опытные факты весьма многочисленны и касаются как самого гормона, так и многих сотен его синтетических аналогов. Однако всем этим работам, как и аналогичным исследованиям других гормонов, свойственны все отмеченные выше слабые моменты чисто эмпирического подхода: случайность выбора аналогов, незнание принципов молекулярной структурной организации гормона и его производных, а также отсутствие системного подхода в изучении функций.

Ни для одного из огромного количества изученных синтетических аналогов ангиотензина II нам не удалось найти опытных данных, характеризующих его действия по всему спектру биологической активности гормона. Обнаружилось лишь несколько аналогов, для которых получены количественные данные по трем функциям ангиотензина II: стимуляции сокращений гладких мышц и регуляции секреции альдостерона и катехоламинов. Соответствующие значения активностей этих аналогов и природных пептидов сопоставлены в табл. 7.

Среди количественных оценок эффективности взаимодействий гормона и его аналогов с рецепторами наиболее непосредственно характеризуют особенности структурной организации молекул величины внутренней активности (α_E) и сродства к рецептору (pD_2) (см. примечания к табл. 7). Для аналогов, обладающих полной внутренней активностью, по величинам pD_2 можно судить об эффективной концентрации антагониста, требуемой для осуществления биологической функции, и, следовательно, о вероятности реализации у данного аналога пространственной структуры, комплементарной активному центру рецептора и отвечающей соответствующему конформационному состоянию гормона. Действительно, чем дальше у антагониста смещено положение конформационного равновесия от актуальной для данной функции пространственной структуры, тем выше должна быть его концентрация для достижения определенного эффекта и тем самым ниже величина его сродства к рецептору.

В то же время, вероятность реализации актуальных конформаций определяется величинами относительной внутренней энергии, которые были найдены нами для гормона и его аналогов при решении прямой и обратной задач. Путем сопоставления данных табл. 6 и 7 попытаемся получить представление о значимости того или иного конформационного состояния для реализации соответствующей функции, т.е. о структурно-функциональной организации ангиотензина II. Заметим, что табл. 6 могла бы быть дополнена сколь угодно большим числом примеров. Не составляет труда, например, рассчитать конформационные возможности всех тех сотен синтетических аналогов ангиотензина II, которые были синтезированы и подвергнуты биологическим испытаниям, увы, очень разрозненным и неполным. Однако при существующем уровне экспериментальных исследований расширение табл. 6 мало что может дать для решения поставленных задач, представленных в табл. 7.

Решение прямой задачи⁸⁴ показало, что конформационные возможности ангиотензина II могут быть описаны немногочисленным набором низкоэнергетических форм, подразделяющихся на две представительные группы A и B и единичные формы $C_1 - F_1$ (табл. 6). Конформации в пределах одной группы имеют одну и ту же пространственную структуру центрального тетрапептидного участка молекулы

$\text{Val}^3 - \text{Tyr}^4 - \text{Val}^5 - \text{His}^6$ и отличаются друг от друга лишь ориентациями N- и C-концевых дипептидных фрагментов.

Результаты, полученные при решении обратной задачи,⁸⁹ свидетельствуют о том, что аминокислотные замены в последовательности ангиотензина II могут приводить к существенным изменениям конформационных возможностей молекулы. При заменах, не затрагивающих функциональных остатков, новые низкоэнергетические пространственные формы не возникают, а имеет место смещение конформационного равновесия в пределах набора предпочтительных форм природного пептида.

Модификации химического строения гормона, как видно из табл. 7, избирательно отражаются на эффективности действий, присущих ангиотензину II. Поскольку экспериментальные данные относятся к взаимодействиям гормона и его аналогов с рецепторами тканей гладких мышц и коры надпочечников, попытаемся вначале идентифицировать оптимальные конформационные состояния ангиотензина II, комплементарные именно этим рецепторам.

Особый интерес здесь могут представить пролинсодержащие аналоги, так как замена в последовательности любого остатка на Pro заметно сказывается на конформационных возможностях всей молекулы. Сопоставим друг с другом и с ангиотензином II пространственные структуры и биологические активности двух таких аналогов — $[\text{Pro}^2]\text{-AT II}$ и $[\text{Pro}^3]\text{-AT II}$.

Замена в последовательности гормона второго остатка на пролин ведет почти к полной потере сродства аналога $[\text{Pro}^2]\text{-AT II}$ к рецепторам гладкомышечной ткани (относительное сродство не превышает здесь 0.7%), а замена третьего остатка оставляет сродство аналога $[\text{Pro}^3]\text{-AT II}$ к рецепторам той же ткани по сравнению с гормоном довольно значительным (40%). В то же время высококонцентрированные дозы второго соединения не оказывают какого-либо воздействия на секрецию альдостерона.⁹²

Резко различаются и конформационные состояния двух пролинсодержащих аналогов. У молекулы $[\text{Pro}^3]\text{-AT II}$ из всех низкоэнергетических конформаций наиболее реальны представители группы A (табл. 6). В случае же $[\text{Pro}^2]\text{-AT II}$ эти конформации практически не реализуются; равновесие сильно смещено в сторону конформаций B_6 и F_1 , наиболее высокоэнергетичных в наборе ангиотензина II.

Таким образом, сопоставление конформационных и биологических свойств гормона и двух его пролинсодержащих аналогов приводит к предположению об актуальности пространственных структур группы A для взаимодействий с рецепторами гладкомышечной ткани. Такое допущение, однако, может показаться не вполне строгим из-за неэквивалентности замен. Если в случае $[\text{Pro}^3]\text{-AT II}$ замена гомологична (Val^3 замещается на Pro^3) и поэтому оказывает исключительно стерическое воздействие на конформационные возможности молекулы, то в случае $[\text{Pro}^2]\text{-AT II}$ она не гомологична (Arg^2 замещается на Pro^2) и, помимо изменений в системе внутримолекулярных невалентных взаимодействий атомов, связана с потерей гуанидиновой группы, которая может играть важную функциональную роль во взаимоотношениях гормона с рецепторами.

Кроме того, предположение об актуальности конформаций A для реализации сократительной функции ангиотензина II в гладких мышцах артерий как будто бы не согласуется с имеющимися данными о другом пролиновом аналоге — $[\text{Pro}^5]\text{-AT II}$. Хотя в литературе почти отсутствует количественная информация о его функциях, тем не менее известно, что прессорная активность этого аналога на порядок меньше, чем у природного пептида (табл. 7), что указывает на его низкое сродство к рецепторам гладкомышечной ткани. Однако конформации группы A, ответственные, по нашему предположению, за сократительную функцию, у $[\text{Pro}^5]\text{-AT II}$ наиболее предпочтительны. Противоречие, на первый взгляд, весьма серьезно, так как в данном случае замена

Таблица 7. Прессорная активность и количественные характеристики некоторых видов биологической активности природных ангиотензинов и ряда их синтетических аналогов

Соединение	Гладкие мышцы ⁴⁵										Прессорная активность, % (см. ⁴⁵)	
	аорта кролика											
	желудок крысы											
	α_E	pD_2	ОС, %	pA_2	α_E	pD_2	ОС, %	pA_2				
АТ II	1.0	8.85	100	—	1.0	7.75	100	—	100	100	—	100
[Pro ²]-АТ II					1.0	5.64	0.7					1.3
[Pro ³]-АТ II			40 ^a									40
[Pro ⁶]-АТ II												10
АТ III	1.0	7.62	5.6	—	1.0	7.5	56	—	15	130	100	38
[Asn ¹]-АТ II	1.0	8.11	18	—	1.0	7.8	105	—	100	100	100	100
[Ala ⁸]-АТ II	0			7.7	0			7.22	21			—
[Leu ⁸]-АТ II	0			8.78	0			8.6		8.53		7.0
[Ile ⁸]-АТ II	0			9.21	0			8.36		9.31		8.53
АТ I	1.0	7.53	5.1		1.0	7.1	22		95	2	5	50

Примечание. α_E — внутренняя активность (отношение максимального отклика, вызываемого агонистом, к максимальному отклику, вызываемому АТ II); pD_2 — отрицательный логарифм концентрации агониста, вызывающий эффект, равный половине максимального (сродство); pA — отрицательный логарифм концентрации антагониста, снижающий эффект агониста в 2 раза; ОС, % — относительное сродство агониста относительно сродства ангиотензина II; ОА — относительная активность (отношение активности агониста к активности ангиотензину II при дозах средней эффективности); ОМИС — относительная мощность ингибирования связывания (отношение концентрации аналога и ангиотензина II, вызывающее вытеснение 50% меченого АТ II при связывании со специфическим рецептором); пропуск в таблице означает отсутствие данных по этому виду активности, прочерк — отсутствие данного вида активности.

^a По отношению к рецепторам матки крысы.

Val⁵ на Pro⁵ гомологична. И тем не менее расхождение может быть только кажущимся, поскольку потеря данным аналогом прессорной активности поддается иной трактовке.

Расчет конформаций молекулы [Pro⁵]-АТ II показал, что включение остатка Pro между Tyr⁴ и His⁶ ведет к существенному ограничению конформационной свободы пептидной цепи и к деформации пространственной молекулы группы A, не выводя, однако, значений двугранных углов φ , ψ за пределы шейпа *fef* центрального тетрапептидного участка. Так, если расстояния между атомами C α остатков тирозина и гистидина в этой группе конформеров у ангиотензина II составляют около 5.5 Å, то у аналога [Pro⁵]-АТ II — 7.4 Å. Кроме того, на активность соединения может повлиять то обстоятельство, что остаток Pro⁵ существенно ограничивает подвижность боковых цепей смежных остатков, которые, несомненно, эффективно взаимодействуют с рецепторами.

И хотя наше предположение о необходимости участия конформаций группы A в реализации сократительной функции ангиотензина II достаточно спорно, тем не менее пусть оно останется рабочей гипотезой.

Веский довод в пользу этого предположения следует из сопоставления конформационных возможностей и биологических активностей молекул ангиотензина II и ангиотензина III — природного гептапептида, отличающегося от рассматриваемого октапептидного гормона отсутствием N-концевого остатка Asp¹. Оба соединения обладают одинаковым спектром биологических действий, однако их эффективности, за исключением функционирования в тканях коры надпочечников, существенно различаются. Многочисленные исследования показали, что хотя эффективность воздействия на все остальные ткани у ангиотензина III снижена по сравнению с ангиотензином II, однако в ткани коры надпочечников гептапептидный гормон вызывает такое же альдостеронстимулирующее действие, как и октипептидный,¹⁰³ а по некоторым данным,⁴⁶ даже несколько превосходит последний.

Если верна наша гипотеза о причине полифункциональности гормонов, то молекула ангиотензина III должна обладать соответствующими конформационными возможностями, адекватно отражающими наблюдающееся сходство и различие в ее биологическом действии по сравнению с молекулой ангиотензина II. Действительно, устранение N-концевого остатка резко смещает конформационное равновесие в сторону структур группы B: наиболее предпочтительной становится конформация B₄(B₅), далее в этой группе идут B₂(B₃), B₁ и B₆, уступающие наиболее выгодной соответственно 1.8 и 4.1 ккал·моль⁻¹ (табл. 6). В группе A имеется лишь одна низкоэнергетическая конформация — A₂ (1.2 ккал·моль⁻¹). Таким образом, среди пространственных структур, родственных низкоэнергетическим конформациям ангиотензина II, у молекул ангиотензина III наиболее вероятны B₄(B₅), A₂, B₂(B₃), B₁ и B₆, т.е. имеет место резкое смещение конформационного равновесия в сторону представителей группы B.

В работе⁹⁹ сообщается, что из двух типов рецепторов (I и II), выделенных из ткани коры надпочечников при помощи уже упоминавшихся нами непептидных антагонистов DUP-89 и WL-19, одинаково хорошо связывающих молекулу ангиотензина II, только рецепторы типа II (см.⁹⁹) имеют высокое сродство к ангиотензину III. Сродство же гептапептидного гормона к рецепторам типа I снижено по сравнению с рецепторами типа II в 12 раз.

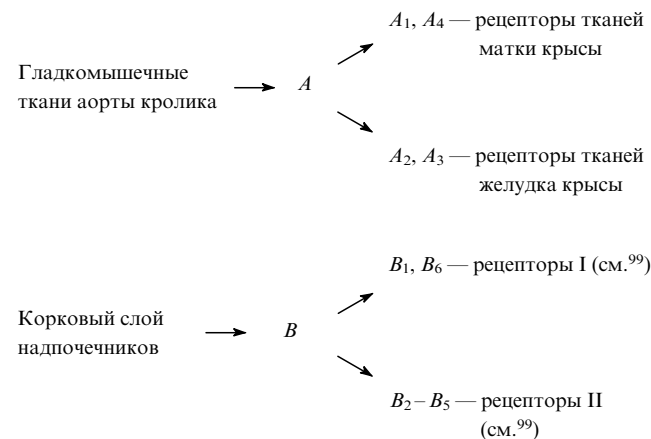
Эффективность взаимодействия ангиотензина III с рецепторами гладкомышечных тканей зависит от источника и органа. К рецепторам ткани желудка крысы сродство гормона в 2 раза ниже чем у ангиотензина II, а к рецепторам ткани аорты кролика оно снижено почти в 20 раз.⁴⁵ Наблюдающееся в этих случаях снижение сродства ангиотензина III к рецепторам можно объяснить более высокой энергией конформаций группы A, ответственных, согласно нашему предположению, за взаимодействие гормона с рецепто-

рами гладкомышечных тканей. Последние, по-видимому, предъявляют различные требования к конформационному состоянию агониста. В этом случае состояния A₁ и A₄ можно отнести к актуальным для взаимодействия гормона с рецепторами ткани аорты кролика, а A₂ и A₃ — к актуальным для взаимодействия гормона с рецепторами ткани желудка крысы.

Высокое сродство ангиотензина III к рецепторам коркового слоя надпочечников согласуется с наибольшей вероятностью реализации конформаций группы B, что позволяет сделать вывод об их актуальности в осуществлении альдостеронстимулирующего действия гормона. Можно пойти дальше и предположить, что конформации B₄(B₅) и B₂(B₃) комплементарны активным центрам рецепторов типа II,⁹⁹ а B₁ и B₆ типа I.⁹⁹

Другой аналог ангиотензина II — [Asn¹]-АТ II почти в полной мере наделен всеми функциями рассматриваемого гормона [Asp¹]-АТ II. Исключение составляют взаимодействия с рецепторами ткани аорты кролика. Конформационные возможности молекул [Asn¹]- и [Asp¹]-АТ II также весьма близки (табл. 6), если не считать различий в энергии конформаций A₁ и A₄ и, следовательно, в вероятности их реализации, которая у [Asn¹]-АТ II существенно меньше. Значительно снижено и сродство этой молекулы к рецепторам аорты кролика (табл. 7). Таким образом, результаты конформационного анализа и данные биологических испытаний этого аналога согласуются со сделанным нами выводом о комплементарности конформаций A₁ и A₄ к рецепторам аорты кролика.

Итак, сравнительный анализ конформационных свойств и биологических активностей гормона и его аналогов показал, что между биологическими действиями и конформационными состояниями ангиотензина II существует зависимость, по которой структурные варианты группы A



взаимодействуют с рецепторами, преобладающими в гладкомышечных тканях, а группы B — с рецепторами, преобладающими в тканях коры надпочечников, причем представители каждой группы в свою очередь распадаются на две подгруппы согласно схеме:

Классификация конформаций по подгруппам соответствует вполне определенным системам внутримолекулярных контактов валентно не связанных атомов.

При решении прямой задачи для ангиотензина II было установлено, что наибольший вклад в стабилизацию конформаций A₁, A₄ и B₂–B₅ вносит остаток Arg². Боковая цепь Asp¹ ориентирована в среду и электростатически взаимодействует лишь с положительно заряженной гуанидиновой группой Arg²; ее энергия взаимодействия Arg² с остальной частью молекулы не превышает < 1 ккал·моль⁻¹ и имеет к тому же дестабилизирующий характер.

Иная система внутримолекулярных контактов имеет место в конформациях A₂, A₃ и B₁, B₆: боковая цепь Arg²

ориентирована в сторону от молекулы и лишь слабо взаимодействует с другими остатками, а Asp¹, напротив, имеет многочисленные стабилизирующие контакты.

Конформации разных подгрупп различаются и по природе стабилизирующих взаимодействий. Если конформации A₂, A₃ и B₁, B₆ предпочтительны по энергии невалентных взаимодействий атомов, то A₁, A₄ и B₂–B₅ — по электростатическим взаимодействиям и водородным связям. Альтернативное отношение конформаций обеих подгрупп к полярности среды при легкости их взаимных переходов делает весьма чувствительным положение конформационного равновесия ангиотензина II к внешним условиям, прежде всего к специфическим взаимодействиям с рецепторами.

Некоторые из приведенных в табл. 6 конформаций ангиотензина II различаются положением С-концевого остатка Phe⁸, значение которого для выполнения гормоном своих функций исключительно велико. Устранение этого остатка лишает ангиотензин практически всех его физиологических действий. Так, у [des-Phe⁸]-АТ II активность была обнаружена лишь по отношению к тканям мозга крысы. Октапептидные аналоги у которых Phe⁸ заменен на другие аминокислотные остатки, как правило, хорошо связываются с рецепторами гормона, но не стимулируют соответствующие сигналы.⁴⁵ Результаты расчета аналогов [Ala⁸]-, [Leu⁸]- и [Phe⁸]-АТ II, приведенные в табл. 6, показывают относительно небольшие изменения конформационных возможностей этих молекул по сравнению с природным пептидом. В то же время ни одна из них, как следует из табл. 7, не обладает полным спектром биологических действий ангиотензина II.

До сих пор мы рассматривали действия гормона и его аналогов на ткани гладких мышц и коры надпочечников. Сведений о взаимодействиях ангиотензина II с рецепторами других тканей очень мало. Известные факты, касающиеся, например, рецепторов мозгового слоя надпочечников,¹⁰⁴ указывают на то, что они предъявляют менее жесткие структурные требования к природе и пространственному строению С-концевого участка последовательности. Так, [His⁹-, Leu¹⁰]-АТ II, предшественник октапептидного гормона, имеющий низкое сродство к рецепторам гладких мышц и коркового слоя надпочечников, проявляет такую же, как ангиотензин II, активность в мозговом слое надпочечников. Синтетический аналог [Ala⁸]-АТ II, выступающий, как уже отмечалось, в большинстве тканей антагонистом ангиотензина II, в мозговом слое тем не менее не блокирует действие гормона, а даже проявляет некоторую агонистическую активность. Таким образом, удлинение пептидной цепи с С-конца и замена Phe⁸ на Ala⁸ не препятствует в данном случае ни связыванию с рецептором, ни его стимуляции.

VII. Заключение

В заключение отметим важную особенность функционирования ангиотензина II, которая состоит во взаимозависимости всех его многочисленных физиологических действий в организме млекопитающих. Ряд факторов, таких как понижение концентрации ионов Na⁺ в крови, уменьшение объема циркулирующей крови, падение артериального давления приводит к увеличению секреции ренина почками и, как следствие, к повышению концентрации ангиотензина II в крови млекопитающих.

Взаимодействие гормона с рецепторами, расположенными в различных тканях, вызывает реакции, направленные на возвращение соответствующих показателей к норме, причем гормон воздействует на тканевом, системном и центральном уровнях. Так, вызванное ангиотензином II повышение тонуса гладкой мускулатуры артериол и усиление секреции катехоламинов мозговым слоем надпочечников приводит к повышению артериального давления.

Задержка воды и ионов Na⁺ в организме осуществляется гормоном главным образом путем стимуляции секреции

альдостерона корковым слоем надпочечников, стимуляции секреции вазопрессина гипоталамо-гипофизарной системой, а также прямым действием гормона на почки. Отмеченные действия ангиотензина II дополняются его воздействием на центральные и периферические отделы нервной системы, опосредующим прессорные эффекты, а также усиливающим жажду и солевой аппетит, что в свою очередь приводит к увеличению объема циркулирующей крови и нормализации давления.

Таким образом, изменение внешних условий вызывает в организме сложный комплекс реакций, стимулированных единым фактором — ангиотензином II, и направленных на достижение единой цели — поддержание постоянства внутренней среды организма.

Способность осуществлять продуктивные взаимодействия сразу с рядом рецепторов и тем самым одновременно реализовывать соответствующее число скоординированных функций обеспечивается изученной нами структурно-функциональной организацией ангиотензина II.

Литература

1. Е.М.Попов. *Молекуляр. биология*, **19**, 1107 (1985)
2. Е.М.Попов. *Структурная организация белков*. Наука, Москва, 1989
3. Е.М.Попов. *Биоорг. химия*, **18**, 1229 (1992)
4. П.Глендсдорф, И.Пригожин. *Термодинамическая теория структуры, устойчивости и флуктуаций*. Мир, Москва, 1973
5. И.Пригожин. *От существующего к возникающему*. Мир, Москва, 1985
6. Е.М.Попов. *Природа*, (6), 59 (1993)
7. D.B.Wetlauffer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **70**, 697 (1973)
8. Г.Н.Тищенко. *Кристаллохимия. Т.13*. Наука, Москва, 1979
9. Е.М.Попов, Г.М.Липкинд, С.Ф.Архипова. В кн. *Конформационные расчеты сложных молекул. (Под ред. А.И.Перельман)*. Народная асвета, Минск, 1970. С.120
10. Е.М.Попов, В.З.Плетнев. В кн. *Конформационные расчеты сложных молекул. (Под ред. А.И.Перельман)*. Народная асвета, Минск, 1970. С.129
11. Е.М.Попов, В.З.Плетнев. *Биофизика*, **16**, 407 (1971)
12. В.З.Плетнев, Е.М.Попов. *Изв. АН СССР. Сер. хим.*, 991 (1970)
13. В.З.Плетнев, Е.М.Попов. *Биоорг. химия*, **1**, 160 (1975)
14. В.З.Плетнев, Е.М.Попов. *Химия природ. соединений*, 220 (1973)
15. Г.Н.Тищенко, З.Каримов, Н.В.Назимова. *Биоорг. химия*, **1**, 375 (1975)
16. Г.Н.Тищенко, З.Каримов, В.В.Борисов. *Биоорг. химия*, **1**, 378, (1975)
17. Г.Н.Тищенко, Н.В.Назимова, В.И.Андрианов, З.Каримов. *Биоорг. химия*, **1**, 386 (1975)
18. Г.Н.Тищенко, В.И.Смирнова, Л.Н.Зейбот, Н.В.Назимова, В.И.Андрианов. *Биоорг. химия*, **2**, 885 (1976)
19. J.Konnert, I.L.Karll. *J. Am. Chem. Soc.*, **91**, 4888 (1969)
20. A.I.Geddes, D.Akrigg. *Acta Crystallogr., Sect. B*, **32**, 3164 (1976)
21. G.N.Tischenko, Z.Karimov, B.K.Vainstein, A.V.Evstratov, V.T.Ivanov, Yu.A.Ovchinnikov. *FEBS Lett.*, **65**, 615 (1976)
22. В.З.Плетнев, Н.М.Галицкий. *Биоорг. химия*, **3**, 1611 (1977)
23. J.A.Hamilton, L.K.Stainrauf, E.Braden. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **64**, 151 (1975)
24. Е.М.Попов, В.З.Плетнев, А.В.Евстратов, В.Т.Иванов, Ю.А.Овчинников. *Химия природ. соединений*, 616 (1970)
25. Yu.A.Ovchinnikov, V.T.Ivanov, A.V.Evstratov, V.F.Bystrov, N.D.Abdullaev, E.M.Popov, G.M.Lipkind, S.F.Arkipova, E.S.Efremov, M.M.Shelyakin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **37**, 668 (1969)
26. С.З.Галактионов, Г.В.Никифорович, Г.И.Чипенс, М.Д.Шендорович. *Ангиотензин. Молекулярные механизмы действия*. Зинатне, Рига, 1979
27. В.С.Спасов, Е.М.Попов. *Биоорг. химия*, **7**, 25; 502 (1981)
28. Е.М.Попов. *Молекуляр. биология*, **9**, 578 (1975)
29. Е.М.Попов. *Int. J. Quantum. Chem.*, (16) 707 (1979)
30. С.В.Anfinsen. *Science*, **181**, 223 (1973)
31. Е.М.Попов, П.Н.Мельников. *Биоорг. химия*, **5**, 1471 (1979)

32. А.Л.Ломизе, Е.М.Попов. *Биоорг. химия*, **8**, 1474 (1982)
33. А.Л.Ломизе, Е.М.Попов. *Молекуляр. биология*, **17**, 1212 (1983)
34. Е.М.Попов, В.Н.Швырков, В.З.Спасов. *Биоорг. химия*, **8**, 61 (1982)
35. Е.М.Попов, Л.И.Измаилова, Ш.М.Мусаев, Р.Э.Алиев, Н.А.Ахмедов, И.С.Максумов. *Биоорг. химия*, **8**, 776 (1982)
36. А.А.Завальный, Е.М.Попов. *Молекуляр. биология*, **16**, 129 (1982)
37. Г.И.Чипенс, Л.К.Полевая, Н.И.Веретенникова, А.Ю.Крикис. *Структура и функция низкомолекулярных пептидов*. Зинатне, Рига, 1980
38. M.Monnier, L.Dubler, R.Cochter, P.F.Maier, H.Tabler, G.Schoenenberger. *Experientia*, **33**, 548 (1977)
39. Е.М.Попов, Н.Н.Севастьянова. *Биоорг. химия*, **7**, 1478 (1981)
40. Е.М.Попов. *Молекуляр. биология*, **11**, 5 (1977)
41. Г.М.Липкинд, И.С.Максумов, Е.М.Попов. *Биоорг. химия*, **1**, 966 (1975)
42. И.С.Максумов, Г.М.Липкинд, Е.М.Попов. *Биоорг. химия*, **2**, 632; 737 (1975)
43. Е.М.Попов, Н.М.Годжаев, Р.Э.Алиев. *Молекуляр. биология*, **20**, 367 (1986)
44. Е.М.Попов. *Структурно-функциональная организация белков*. Наука, Москва, 1992
45. D.Regoli, W.K.Park, F.Rioux. *Pharm. Rev.*, **26**, 68 (1974)
46. M.J.Peach, J.A.Ackery. *Fed. Proc.*, **35**, 2503 (1976)
47. D.J.Ramsay. *Front. Neuroendocrinol.*, **7**, 263 (1982)
48. M.T.Schiavone, R.A.S.Santos, K.B.Broshihan, M.C.Khosla. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 4095 (1988)
49. A.J.Prange, C.B.Nemeroff, M.A.Lipton. In *Psychopharmacology: Generation of Progress*. Wiley, New York, 1978. P.637
50. P.J.Harris, L.G.Navar. *Am. J. Physiol.*, **248**, 621 (1985)
51. G.P.Brown, J.G.Douglas, J.Krontiris-Litowitz. *Endocrinology*, **106**, 1923 (1980)
52. F.E.Freedlander, T.L.Goodfriend. *Fed. Proc.*, **36**, 481 (1977)
53. T.B.Rogeas. *J.Biol. Chem.*, **259**, 8108 (1984)
54. M.J.Peach, F.M.Bumpus, P.A.Khairalah. *J. Pharmacol. and Exp. Ther.*, **176**, 366 (1971)
55. K.Arakawa, F.M.Bumpus. *J. Am. Chem. Soc.*, **83**, 728 (1961)
56. A.Y.Ferreira, O.G.Hampe, A.C.M.Paiva. *Biochemistry*, **8**, 3483 (1969)
57. L.Juliano, A.C.M.Paiva. *Biochemistry*, **13**, 2445 (1974)
58. J.D.Glickson, W.D.Cunningham, U.G.R.Marshall. *Biochemistry*, **12**, 3684 (1973)
59. R.R.Smeby, K.Acha, F.M.Bumpus, M.M.Harsh. *Biochim. Biophys. Acta*, **58**, 550 (1962)
60. S.Fermandjian, P.Fromageot, A.M.Tishenko, J.P.Leicham, M.Lutz. *Eur. J. Biochem.*, **28**, 174 (1972)
61. J.M.Matsoukas, G.T.Moore. *Spectrosc. Lett.*, **21**, 477 (1988)
62. J.M.Matsoukas, G.J.Moore. *Arch. Biochem. Biophys.*, **248**, 419 (1986)
63. M.P.Printz, H.P.Williams, L.C.Craig. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **69**, 378 (1972).
64. E.Nabedrick, C.Thieri, P.Calvest, S.Fermandjian. *FEBS Lett.*, **58**, 273 (1975)
65. L.C.Craig, E.J.Harfenist, A.C.Palladini. *Biochemistry*, **3**, 764 (1964)
66. M.T.Franze de Fernandes, A.E.Delius, A.C.Paladini. *Biochim. Biophys. Acta*, **154**, 223 (1968)
67. T.B.Paiva, A.C.Paiva, H.A.Scheraga. *Biochemistry*, **2**, 1327 (1963)
68. R.E.Lenkinski, R.L.Stephens, N.R.Krishna. *Biochim. Biophys. Acta*, **667**, 157 (1981)
69. H.E.Bleich, R.E.Galardy, M.P.Printz. *J. Am. Chem. Soc.*, **95**, 2041 (1973)
70. G.R.Marshall. *Biochemistry*, **12**, 19 (1973)
71. K.Lintner, S.Fermandjian, P.Fromageot, M.C.Khosla, R.R.Smeby, F.M.Bumpus. *FEBS Lett.*, **56**, 366 (1975)
72. S.Fermandjian, J.L.Morgat, P.Fromageot. *Eur. J. Biochem.*, **24**, 252, (1971)
73. D.Grefts, S.Fermandjian, P.Fromageot, M.S.Khosla, R.R.Smeby, F.M.Bumpus. *Eur. J. Biochem.*, **61**, 297 (1976)
74. И.П.Секацис, Ю.А.Анцанс, Д.А.Бисениеце, Г.И.Чипенс. *Изв. АН СССР. Сер. хим.*, 478 (1988)
75. F.M.Bumpus. *Fed. Proc.*, **36**, 2128 (1977)
76. И.П.Секацис, Э.Э.Лиепиньш, Ю.А.Анцанс, А.А.Берга, Г.И.Чипенс. *Биоорг. химия*, **7**, 971 (1981)
77. R.Deslauriers, A.C.Paiva, K.Schaumburg, J.C.P.Smith. *Biochemistry*, **14**, 878 (1975)
78. J.D.Glickson, J.Dadok, G.R.Marschall. *Biochemistry*, **13**, 11 (1974)
79. G.R.Marschall, H.E.Bosshard, W.H.Vine, J.D.Glickson. *Nature. New Biol.*, **245**, 125 (1973)
80. J.L.De Coen, E.Ralson. *Biopolymers*, **16**, 1929 (1977)
81. Г.В.Никифорович, С.Г.Галактионов, Г.И.Чипенс. *Конформации пептидных биорегуляторов*. Медицина, Москва, 1983
82. C.Marchionini, B.Maigret, S.Premilat. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **112**, 339 (1983)
83. G.V.Nikiforovich, B.Vesterman, J.Betins, L.Podins. *J. Biomol. Struct. Dynam.*, **4**, 1119 (1987)
84. Т.В.Гогитидзе, Е.М.Попов. *Биоорг. химия*, **19**, 517 (1993)
85. Е.М.Попов. *Int. J. Quantum. Chem.*, **16**, 707 (1979)
86. N.A.Akhmedov, G.A.Akhverdieva, N.M.Godjaev, E.M.Popov. *Int. J. Pept. Protein Res.*, **27**, 95 (1986)
87. Е.М.Попов. *Физика молекул*. Наукова думка, Киев, **8**, 69 (1980)
88. IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature. *Biochim. Biophys. Acta*, **262**, 1 (1971)
89. Т.В.Гогитидзе, Е.М.Попов. *Биоорг. химия*, **19**, 693 (1993)
90. В.Р.Роуе, К.Л.Грове, Д.Л.Сейлор, Р.С.Спех. *Eur. J. Pharmacol.*, **186**, 339 (1990)
91. В.З.Спасов, Е.М.Попов. *Биоорг. химия*, **7**, 502 (1981)
92. Н.Миками, Т.Огihара, К.Катахиро, Н.Имай, К.Кубахара, Ф.М.Бампус, М.С.Хосла. *J. Cardiovasc. Pharm.*, **9**, 242 (1987)
93. Д.А.Бисениеце, Ю.Е.Анцанс, М.В.Мышлякова, Г.Г.Кубрик, Е.А.Порушкевич, М.И.Раткевич, Г.И.Чипенс. *Биоорг. химия*, **13**, 149 (1987)
94. G.J.Trache, J.A.Ackery, M.J.Peach. *J. Cardiovasc. Pharm.*, **3**, 838 (1980)
95. R.B.Howard, R.R.Smeby. In *Handbook of Hypertension. V.8* (Eds Birkenhager Reid) Amsterdam, 1986. P.389
96. M.A.Ravi Kiron, R.L.Soffer. *J.Biol. Chem.*, **264**, 4138 (1989)
97. M.Tence, A.Petip. *Mol. Cell Endocrinol.*, **63**, 111 (1989)
98. A.M.Capponi, K.J.Catt. *J. Biol. Chem.*, **255**, 12081 (1980)
99. R.S.L.Chang, V.J.Lotti. *Mol. Pharmacol.*, **37**, 347 (1990)
100. R.S.L.Chang, V.J.Lotti, T.B.Chen, K.A.Faust. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **171**, 813 (1990)
101. R.C.Speth, K.H.Kim. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **169**, 997 (1990)
102. Т.В.Гогитидзе, Е.М.Попов. *Биоорг. химия*, **19**, 773 (1993)
103. S.Salman, A.Baucal, S.Water, F.M.Bumpus, K.J.Catt. *Endocrinology*, **97**, 275 (1975)
104. M.J.Peach. *Circ. Res.*, **28**, 107 (1971)

STRUCTURE AND STRUCTURE-FUNCTION RELATIONS OF NATURALLY PEPTIDES

E.M.Popov

Moscow State Correspondence Institute of Food Industry

73, Zemlyanoi Val, 109803 Moscow, Russian Federation, Fax +7(095)292-6511

Structure and structure-function relations of naturally occurring oligopeptides and peptide receptors are discussed. The available data are analysed, and an approach to problem of low-molecular peptides in the direction from structure to function is proposed. The diverse biological activities of oligopeptides are shown to arise from a restricted number of the preferable spatial structures which may occur under physiological conditions. Each particular function of an oligopeptide is connected to a definite spatial structure, belonging to the set of low-energy conformations of the free molecule. A method is proposed which enables to construct a synthetic analog with the predetermined physiologically active conformation, prior to all chemical and biological tests. The suggested approach is described in details for angiotensin II and its analogs, with special regards to the quantitative characteristics of their biological activities.

Bibliography — 104 references.

Received 25th August 1994