

Тритиевая планиграфия биологических систем

А.В.Шишков, Л.А.Баратова

*Институт химической физики им. Н.Н.Семенова Российской академии наук
117334 Москва, ул.Косыгина, 4, факс (095)938–2156*

*Институт молекулярной и физико-химической биологии им. А.Н.Белозерского
Московского государственного университета им. М.В.Ломоносова
117400 Москва, Воробьевы горы, факс (095)939–3181*

Перенос идей и методов ядерной физики и ядерной химии на исследования в области структурной биологии привел к созданию нового метода изучения доступной поверхности и пространственной структуры биологических объектов. В обзоре рассматриваются работы, явившиеся базой метода тритиевой планиграфии, и основные направления их развития в приложении к задачам молекулярной биологии.
Библиография — 129 ссылок.

Оглавление

I. Введение	825
II. Основы метода	826
III. Исследование доступной поверхности белков. Границы применимости метода	830
IV. Конформационные переходы в белках	833
V. Доступная поверхность и внутримолекулярная динамика белков	834
VI. Моделирование пространственной структуры белков	835
VII. Пространственная организация надмолекулярных систем	836

I. Введение

Последние достижения в изучении многих биологических событий на молекулярном уровне стимулировали поиск и разработку новых подходов к исследованию структуры надмолекулярных систем, к определению размера и состава поверхности взаимодействующих компонентов системы, к изучению механизма специфического белок-белкового и белок-нуклеинового узнавания.

Единственным экспериментальным методом, дающим исчерпывающие данные о пространственной структуре, а следовательно, и о поверхности объекта, является рентгено-структурный анализ с высоким ($1-2 \text{ \AA}$) разрешением. Однако сфера его применения ограничена сравнительно узким кругом объектов, которые могут быть получены в форме высокоупорядоченных кристаллов. Наряду с чисто техническими проблемами, связанными с выращиванием таких кристаллов, особенно в случае больших и лабильных комплексов, существуют определенные трудности с интерпретацией сложных дифракционных картин. Кроме того, до настоящего времени остается открытым вопрос о тождественности структуры одного и того же объекта в кристаллическом образце и в растворе — естественной среде функционирования биологических систем.

В связи с этим для изучения относительно низкомолекулярных пептидов и белков до сих пор применяются такие методы, как ЯМР.¹

Для крупномасштабных объектов (100 нм и выше) информация о структуре может быть получена с помощью методов электронной микроскопии, которые в сочетании с современной системой обработки данных позволяют достичь разрешения порядка $20 \text{ \AA}$, а при криоэлектронно-кристаллографическом исследовании возможно разрешение $5 \text{ \AA}$.^{2,3} Это позволяет изучать молекулярную архитектуру комплексов и распределение масс компонентов в них, относительную локализацию молекул, четвертичную структуру белка (см., например,⁴).

Говоря о методах исследования поверхности, нельзя не упомянуть о сравнительно новом методе сканирующей туннельной микроскопии, позволяющем достичь рекордной разрешающей способности ($\sim 1 \text{ \AA}$). Данный метод сегодня еще трудно представить в качестве ординарного инструмента исследования. Возможность его применения к биологическим объектам носит в основном иллюстративный характер, однако не исключено, что с его развитием мы получим информацию на уровне локализации отдельных атомов.⁵

Для изучения топографии поверхности и структуры биологических систем широко используются традиционные подходы, связанные с введением различного рода зондов и модифицирующих агентов. Создание же низкочастотных спектрометров ЭПР сделало возможным изучать *in vivo* целые клетки и даже кусочки тканей.⁶ Однако получаемая в этом случае структурная информация относится лишь к локальным фрагментам объекта или в лучшем случае к ближайшему к репортерной метке окружению и ничего не говорит о структуре объекта в целом. Не исключаются также при введении различного рода зондов возмущения, которые могут существенно исказить нативную структуру объекта.

А.В.Шишков. Доктор химических наук, профессор, заведующий отделом строения вещества ИХФ РАН. Область научных интересов: структура биологических макромолекул.

Л.А.Баратова. Кандидат химических наук, заведующая отделом хроматографии ИФХБ МГУ. Область научных интересов: структура макромолекул и надмолекулярных систем.

Дата поступления 8 июня 1994 г.

Использование во всех описанных выше исследованиях подобного рода модифицирующих агентов, меченных радиоактивными изотопами, во много раз увеличивает чувствительность детектирования. В качестве примеров можно привести успешные работы по селективному иодированию поверхностных мембранных белков клетки⁷ и интактных вирусных частиц гепатита А.⁸

Однако существует и другая группа методов, основанная на использовании радиоактивных меток. В таких методах данные о структуре получают непосредственно из способа введения метки, когда определяется доступность тех или иных групп в пространственной структуре для соответствующего тестирующего агента.

В качестве удачного примера, можно привести исследование поверхности специфических комплексов белок—транспортная РНК, в котором метка вводилась в положение Н-8 пуриновых оснований РНК путем обмена с водой НТО.⁹ Естественно, существует достаточно много случаев, когда применяются обе группы методов, т.е. определяют одновременно и стерическую доступность реакционноспособной группы (по выходу меченого продукта) и ее структурное окружение (например, по спектральным характеристикам).

Метод тритиевой планиграфии по своей сути относится ко второй группе методов, он отличается отсутствием селективности мечения. Как будет показано ниже, с его помощью можно определить стерическую доступность углеводородных групп ($-\text{CH}$, $-\text{CH}_2$, $-\text{CH}_3$) для атаки горячего атома трития в условиях прямого пролета. Результат такой атаки — замещение водорода ^1H на его радиоактивный изотоп тритий, которое происходит во всех стерически доступных фрагментах объекта с приблизительно равной вероятностью и не сказывается на его свойствах: меченый продукт и немеченная исходная молекула химически тождественны. Сфера применения этого метода весьма широка, так как практически все биологические молекулы представляют собой производные углеводов. Надо особо отметить, что малые размеры атома трития обеспечивают более высокий уровень структурной дискриминации, чем тот, который можно достичь, применяя более объемные зонды или метки.

В настоящем обзоре мы не будем касаться различных методов введения тритиевой метки, адресуя заинтересованного читателя к монографии¹⁰, а ограничимся рассмотрением метода тритиевой планиграфии, в котором для генерации горячих атомов трития используется термическая диссоциация молекулярного трития.

II. Основы метода

В основе метода тритиевой планиграфии лежат химические реакции с участием быстрых частиц (так называемая химия горячих атомов), изучение которых было начато еще в 50–60-е годы. Важнейшим результатом этих работ явилось представление о функции возбуждения химической реакции, т.е. зависимости вероятности (или сечения) реакции от энергии частиц. Было показано, что во многих случаях эта функция имеет пороговый характер и сечение реакции достаточно резко возрастает от нулевого значения в сравнительно узком интервале энергий. Если в одной и той же системе имеют место сразу несколько реакций с разными порогами, то, варьируя энергию, очевидно, можно сдвинуть процесс в ту или иную сторону. Так, если взаимодействие частиц X и Y может протекать по трем каналам с энергиями активации E_1 , E_2 и E_3 , причем $E_1 < E_2 < E_3$, то при $E > E_3$ в системе могут образоваться все три продукта. При $E_2 < E < E_3$ возможны только два канала реакций и, наконец, при $E_1 < E < E_2$ осуществляется лишь одна реакция (рис. 1).

Основным химическим процессом, протекающим при взаимодействии горячих атомов водорода с насыщенными углеводородами, является реакция замещения, которая, в

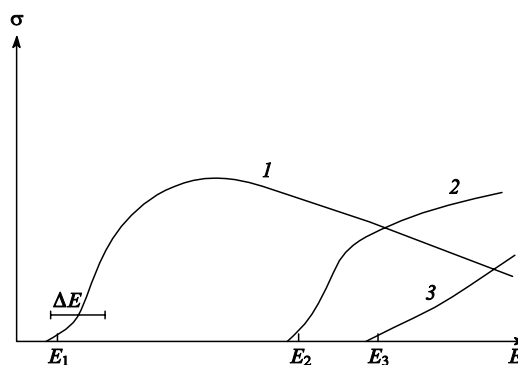


Рис. 1. Зависимость вероятности химических реакций (σ) от энергии взаимодействующих частиц (E) для трех возможных каналов с порогами E_1 , E_2 и E_3 . ΔE — потеря энергии при однократном нереакционном столкновении

зависимости от энергии атомов, может идти либо по механизму прямого замещения (энергия активации 1.5 эВ),^{11, 12}



либо через стадию образования свободного радикала



где звездочкой обозначена горячая частица, а точкой — свободный радикал. Лимитирующей стадией является отрыв водорода, энергия активации которого в зависимости от типа связи лежит в пределах 0.3–0.4 эВ.¹³ Реакция рекомбинации (3) имеет нулевую энергию активации и протекает с участием тепловых атомов водорода. Нереакционное столкновение сопровождается потерей энергии (термализацией) горячего атома



(здесь $(\text{RH})'$ — возбужденная молекула). Вероятность столкновения и величина передаваемой при однократном столкновении энергии зависят от скорости налетающей частицы, а также от структурных и энергетических характеристик молекулы-партнера. При использовании вместо обычного водорода его изотопа (трития), продукт замещения оказывается меченым. Тритиевая планиграфия как метод изучения доступной поверхности и пространственной структуры объекта реализуется только при условии, когда химическая реакция замещения, приводящая к включению метки, происходит при первом столкновении горячего атома с молекулой углеводорода. Для этого, очевидно, нужен источник атомов с энергией, удовлетворяющей условиям $0.3 < E < 1.5$ эВ и $E - \Delta E < 0.3$ эВ, где ΔE — потеря энергии при нереакционном столкновении. В этом случае одно нереакционное столкновение исключает возможность последующей реакции и в системе реализуется только одна реакция (2) — отрыв водорода.

Идеальным вариантом явилось бы наличие источника моноэнергетических частиц с указанным диапазоном энергий, что далеко не просто осуществить на практике. В методе тритиевой планиграфии используется процесс атомизации двухатомных газов на нагретых металлических нитях, изучение которого было начато еще Лэнгмюром.¹⁴ На поверхности накаливаемой нити молекулы газа диссоциируют на атомы, которые испаряются с поверхности с энергией, соот-

ветствующей температуре нити. Этот способ использовался в ряде работ по изучению реакций атомов кислорода и водорода.^{15, 16}

При температуре нити 2000 К средняя энергия вылетающих атомов составляет 0.17 эВ и в максвелловском спектре атомарного пучка ~25% атомов имеют энергию, достаточную для отрыва водорода ($E \geq 0.3$ эВ).¹⁷ Доля частиц с энергией 1.5 эВ, которые могут замещать водород по механизму прямого замещения (реакция (1)), мала (< 3%), поэтому вкладом реакции (1) можно пренебречь.

Первые попытки применить метод термической активации для получения меченых соединений были сделаны еще в середине 60-х годов. Мозер с соавт.¹⁸ подвергли бомбардировке атомами трития пленки сахаров и хотя меченые сахара были получены, высокий выход продуктов деструкции уже тогда заставил усомниться в практической пригодности метода. По этим же причинам не получили дальнейшего развития и некоторые другие работы, например, попытки метить целые гранулы крахмала.¹⁹ Основной причиной деструкции, как оказалось, было использование слишком толстых мишеней, препятствующих отводу тепла из зоны реакции. Поверхность мишени нагревалась в результате поглощения светового излучения нити, теплопередачи через молекулярный газ, а также вследствие выделения тепла при взаимодействии атомов трития с веществом. Позже было показано, что при эффективном отводе тепла можно достичь практически 100%-ной степени сохранения вещества.²⁰ Необходимо работать с тонкими пленками органических веществ и при термостатировании жидким азотом. Температура мишени даже при длительных экспозициях превышает температуру жидкого азота не более чем на 10–15 К.²¹ Низкая температура мишени (77 К) ограничивает подвижность образующихся в результате отрыва водорода свободных радикалов, поэтому основной путь их гибели — рекомбинация с термализованными атомами трития с образованием исходной меченой молекулы (реакция (3)).

Возможность изучения доступной поверхности и пространственной структуры макромолекул определяется малой величиной пробега атомов трития, сохраняющих способность вступать в реакции с веществом мишени. Эксперименты для прямого измерения величины пробега реакционноспособных атомов трития довольно сложны. Однако эту величину можно рассчитать при определенных допущениях, а также получить на основании некоторых косвенных данных. Расчеты показывают, что при начальных энергиях горячих атомов трития, близких к пороговой для реакции отрыва, уже одного нерелевантного столкновения достаточно для перевода частицы в область, в которой отрыв водорода уже невозможен. На рис. 2 представлена зависимость изменения доли атомов трития с энергией $E \geq 0.3$ эВ по мере прохождения слоя органического вещества. Видно, что если при $X = 0$ (поверхность объекта или первое столкновение атома трития с молекулой) доля реакционноспособных атомов составляет 26%, то уже после прохождения ими слоя толщиной 6 Å, эта величина уменьшается до 0.4%. Реально длина пробега реакционноспособных атомов (толщина реакционного слоя) еще меньше, так как их число в пучке, проходящем через мишень, уменьшается и за счет химической реакции, сечение которой для атомов с энергией выше порогового значения сопоставимо с сечением столкновения.¹⁰ Это означает, что если в качестве мишени рассматривать макромолекулу, то распределение метки по ее фрагментам будет характеризовать их стерическую доступность для столкновения с первичной бомбардирующей частицей, т.е. доступную для атомов трития поверхность макромолекулы. Оценить толщину реакционного слоя можно также на основании результатов экспериментов по введению тритиевой метки в адсорбционные слои поверхностно-активных веществ с разной длиной углеводородной цепи (от C_1 до C_{16}).²² На основе зависимости выхода меченого продукта

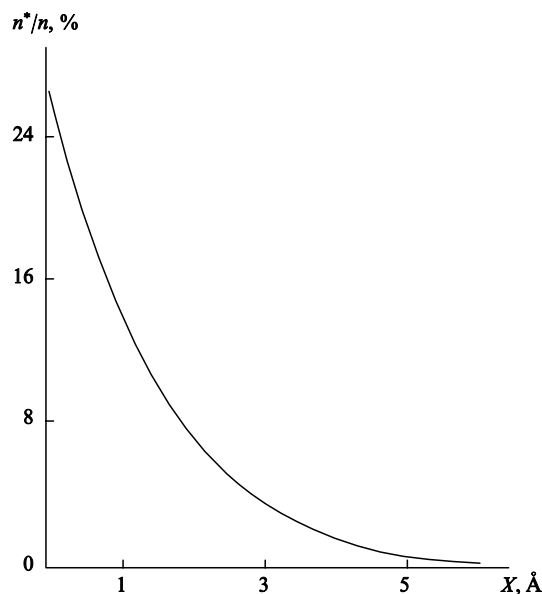


Рис. 2. Уменьшение доли реакционноспособных частиц при прохождении слоя толщиной x в конденсированном органическом веществе (расчет для атомов с температурой 2000 К при условии упругого замедления, $E_{\text{акт}} = 0.3$ эВ)

(включения метки) от длины молекулы и ее ориентации на поверхности раздела фаз был сделан вывод, что изменение толщины слоя на одну метиленовую группу, т.е. на ~3 Å, существенно меняет выход меченого продукта. Эта величина может служить количественной характеристикой толщины реакционного слоя. К такому же значению приводят и эксперименты по включению трития в белок миоглобин, о которых будет сказано ниже.

Принципиальная схема установки, используемой во всех экспериментах по тритиевому мечению, приведена на рис. 3. Центральный узел установки — реактор — представляет собой стеклянный сосуд цилиндрической формы 1, вдоль оси которого натянута вольфрамовая нить 2, нагреваемая электрическим током. Вещество-мишень 3 в виде тонкой пленки наносится на боковые стенки сосуда, охлаждаемого жидким азотом 4. Реактор вакуумируется до остаточного давления 10^{-5} мм рт.ст. и затем в систему подается газообразный тритий. В обычных используемых реакционных сосудах диаметром 60 мм давление молекулярного трития составляет $5 \cdot 10^{-3}$ мм рт.ст. При нагреве нити до 2000 К на ее поверхности происходит атомизация трития, и образовавшиеся атомы в условиях свободного пробега до мишени бомбардируют стенки реактора. Детали эксперимента и последовательность операций довольно подробно описаны в работе¹⁰, а в данной главе мы рассмотрим лишь способы приготовления мишени и общую методологию анализа распределения метки.

Наиболее простой способ — лиофилизация раствора вещества. При этом, однако, необходимо обратить внимание на то, что получающаяся пленка должна плотно прилегать к стенкам реактора по всей его внутренней поверхности. Кроме того, следует помнить, что сам процесс лиофильной сушки может сказаться на структуре исследуемого объекта.

При изучении структуры макромолекулы непосредственно в растворе мишень может быть приготовлена «размазыванием» раствора вещества в виде тонкой пленки, что достигается быстрым вращением реактора, погруженного в жидкий азот. Для многих объектов этот способ дает хорошие результаты. Однако существуют по крайней мере две причины, ограничивающие его использование. Первая —

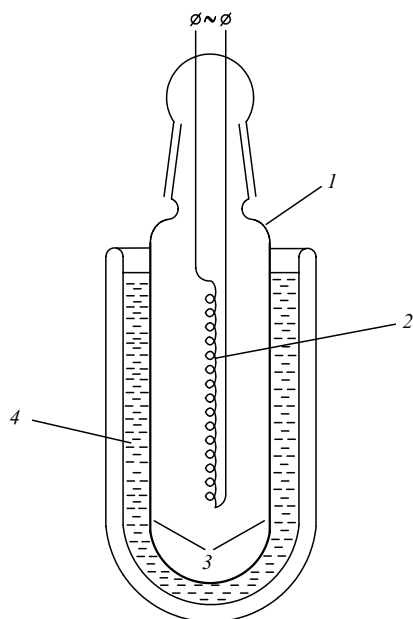


Рис. 3. Стеклянный реактор для тритиевой бомбардировки.

кристаллизация воды из-за относительно низкой скорости замораживания. При погружении сосуда в жидкий азот последний закипает и вблизи стенок образуется тонкий слой газа, замедляющий охлаждение. Этого можно избежать, используя другие хладагенты, например жидкий этан, однако работа с ним имеет свои неприятные особенности. Образование кристаллической фазы льда нежелательно при работе с объектами, имеющими «внутреннюю» воду, — макромолекулами и их комплексами (включая кластеры), содержащими более 10 молекул воды, липосомами, целыми клетками.

Второе ограничение связано со спецификой метода. Так как включение метки ограничивается зоной, доступной для первого столкновения налетевшего из газовой фазы атома трития, т.е. поверхностью мишени, а реально измеряется величина удельной радиоактивности, то необходимо знать или хотя бы контролировать концентрации растворенного вещества на поверхности и в объеме образца. При описанном выше способе приготовления мишени в течение некоторого времени существует жидкий раствор, а значит и граница раздела фаз вода/воздух. По сути, бомбардировке атомарным тритием подвергается адсорбционный слой молекул, параметры которого определяются процессом адсорбции. Концентрация молекул растворенного вещества в таком слое описывается изотермой адсорбции. Удобнее всего работать в условиях полного насыщения поверхностного слоя, что обеспечивает достаточно хорошую воспроизводимость результатов даже в случае, если поверхностная концентрация вещества неизвестна. Как показывают расчеты, время образования такого насыщенного слоя для растворов макромолекул составляет несколько минут ($\sim 2-5$ мин), что сопоставимо со временем приготовления образца. Образование насыщенного слоя подтверждается наблюдаемой в экспериментах зависимостью от концентрации раствора.²² В случае веществ с дифильной природой при таком способе приготовления мишени адсорбция может сопровождаться ориентацией молекул относительно границы раздела фаз, и распределение метки в этом случае будет отражать не структурные особенности объекта, а характер ориентации. Для низкомолекулярных веществ ориентационные эффекты проявляются особенно ярко. Ориентация макромолекул требует больше времени, их дифильность выражена слабее.

Быстрое замораживание раствора «напылением» позволяет избежать этих двух недостатков: кристаллизации воды и вклада адсорбционных процессов. Раствор вещества специальным приспособлением типа пульверизатора разбрызгивается в виде мельчайших капель на предварительно охлажденную жидким азотом внутреннюю поверхность реактора. Время существования жидкой капли, а следовательно, и границы раздела фаз вода/воздух мало (время пролета от сопла распылителя до стенки) и адсорбция не успевает произойти. Скорость же охлаждения при попадании капли на поверхность реактора при 77 К так высока, что раствор замерзает в форме стекла. При этом мы сталкиваемся с ситуацией, которая реализуется на свежеприготовленной поверхности скола твердого тела. Концентрация молекул на поверхности скола может быть связана с объемной простым соотношением $C_s = C_v^{2/3}$. В самом деле, в экспериментах как с низкомолекулярными веществами, так и с растворами белков наблюдалась зависимость величины введенной активности от концентрации, отвечающая приведенному соотношению, т.е. $I = C_v^{0.67}$ (см.^{10, 22, 23}).

В работе Юсупова и Спирина²⁴ был предложен оригинальный способ приготовления мишени, исключающий артефакты, связанные с кристаллизацией воды и адсорбцией вещества на поверхности раздела фаз. Раствор или суспензия вещества по каплям вносится в жидкий азот. Образовавшиеся частички льда растираются непосредственно в жидком азоте и такая «кашица» наносится на стенки реактора. Жидкий азот быстро выкипает, а частички льда остаются плотно «прилипшими» к стенкам реактора. Полученные результаты свидетельствуют об эффективности предложенного способа, однако для его осуществления требуются определенные навыки.

Говоря о технике метода, следует особо сказать о факторах, влияющих на воспроизводимость получаемых результатов. Среди «обычных» факторов, таких как точность измерения радиоактивности, определения температуры нити, давления молекулярного трития, времени экспозиции, а также погрешности, вносимые используемыми методами анализа, необходимо иметь в виду и обязательную воспроизводимость по величине общей площади поверхности мишени, бомбардируемой атомами трития. При использовании техники напыления раствора или выпаривания из суспензии достичь воспроизводимости общей площади поверхности мишени удастся с трудом. Для корректного сравнения результатов отдельных экспериментов необходимо производить нормировку получаемых величин на суммарный поток атомов трития, прореагировавших с поверхностью мишени. Очевидно, последняя величина соответствует суммарной радиоактивности образца, включающей радиоактивность как самого вещества, так и растворителя. При соблюдении всех прочих условий стандартизации эксперимента отношение радиоактивности исследуемого вещества (количества метки, включенной в С—Н-связи) к потоку атомов трития должно быть постоянно для данного вещества. Дополнительным способом стандартизации эксперимента, а в некоторых случаях и единственно возможным, является использование различного рода мониторов — органических веществ, помещаемых на фиксированном расстоянии от нити. В качестве подобных мониторов могут использоваться различные полимерные пленки, целлюлозные и бумажные фильтры и т.п.

При исследовании белков для того чтобы от величины включения метки перейти к определению стерической доступности или, что то же, к площади доступной поверхности, необходимо учесть вероятность включения трития в остатки аминокислот разного типа в условиях их одинакового экспонирования. Такие калибровочные коэффициенты нужны и во всех других случаях, когда объект исследования состоит из компонентов разной химической природы. Было сделано несколько попыток определить относительные реак-

ционные способности аминокислотных остатков, для чего сравнивались свободные аминокислоты,²⁵ короткие пептиды,²³ определялось включение метки в аминокислотные остатки в белках с известной пространственной структурой, в которых доступность (экспонированность) остатков могла быть рассчитана по данным рентгеноструктурного анализа. Хотя результаты разных авторов, полученные для различных систем, несколько отличаются друг от друга, суммируя их, можно утверждать следующее:

1) в белках существует линейная связь между включением метки и рассчитанной величиной площади доступной поверхности углеводородных фрагментов аминокислотного остатка;

2) природа соседнего с данным остатком по полипептидной цепи не сказывается на величине включения метки, нормированной на единичную площадь доступной поверхности; не зависит эта величина также и от места нахождения остатка — на N-или C-конце пептида;

3) включение метки в остатки разных аминокислот происходит с приблизительно равными вероятностями в расчете на одну C—H-связь или на единицу площади доступной поверхности.

Отдельного упоминания заслуживают результаты работы Гедровича и Бадуна,²³ согласно которым относительные реакционные способности трех аминокислот — валина, лейцина и изолейцина — в составе ди- и трипептидов оказались в несколько раз выше, чем для других остатков. Авторы объясняют это наличием в боковой группе этих аминокислот третичных атомов углерода, отрыв водорода от которых протекает существенно легче.²⁶ В таблице приведены вероятности включения метки в остатки аминокислот, установленные в экспериментах с модельным белком лизоцимом, которые являются с нашей точки зрения, наиболее достоверными.

В заключение, очевидно, следует остановиться на общей методологии анализа распределения метки в исследуемом объекте. Она зависит от стоящей перед исследователем задачи и определяется необходимым уровнем «разрешения». Уже первая стадия — определение общей метки, включенной в образец после удаления меченого растворителя, т.е. суммы лабильной (обменоспособной) и стабильной (включенной в C—H-связи) меток, а также меченой воды, прочно связанной с поверхностью макромолекулы — позволяет определить общую площадь доступной поверхности объекта. Так как величина общей метки, как правило, на 2–3 порядка превышает величину стабильной метки в C—H-связях, то различия в вероятностях взаимодействия трития с аминокислотами разной природы здесь не имеют значения.

Вероятность включения метки (K) в остатки аминокислот лизоцима, нормированные на единицу площади доступной поверхности углеводородного фрагмента (C_α —H, боковые группы)⁴⁵

Остаток аминокислоты	K^a	Остаток аминокислоты	K^a
Lys	0.12	Pro	0.11
His	0.16	Ala	0.12
Arg	0.10	Val	0.11
Asx	0.10	Ile	0.10
Glx	0.20	Leu	0.08
Thr	0.10	Tyr	0.07
Ser	0.10	Phe	0.09
Gly	0.09		

^a Среднее квадратичное отклонение 20%.

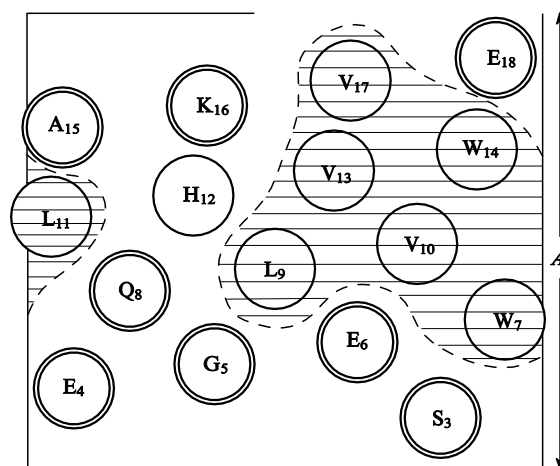


Рис. 4. Схема «развертки» поверхности α -спирального участка А белка миоглобина кашалота (остатки 4–18).

Для обозначения аминокислот использован однобуквенный код. Заштрихованные области — остатки аминокислот, стерически недоступные для взаимодействия с атомами трития (область «тени»)

Для предварительных оценок, а также для решения довольно широкого круга задач, в которых важно знать общий аминокислотный состав поверхности, достаточно определить включение метки в аминокислотные остатки разного типа. Для этого освобожденный от лабильной метки белок (путем диализа, хроматографии, электрофореза и т.п.) гидролизуют и определяют включение метки в индивидуальные аминокислоты, проводя анализ гидролизатов с одновременным измерением радиоактивности.

В ряде случаев необходимо определить распределение метки по полипептидной цепи белка. Для этого белок фрагментируют на пептиды, смесь пептидов разделяют, пептиды идентифицируют, гидролизуют и далее определяют включение метки в аминокислоты. Очевидно, что идеальная ситуация — это получение в результате фрагментации белка пептидов, в которых каждая аминокислота встречается однократно. На практике это удается крайне редко, однако необходимо стремиться к тому, чтобы число повторов было минимальным. И, наконец, возможен сиквенс пептидов с анализом активности в каждой из отщепляемых аминокислот.

Таким образом, правильно приготовив мишень, проведя мечение образца и выбрав соответствующую тактику анализа распределения метки, можно использовать распределение метки для построения модели пространственной структуры. Эта возможность впервые была продемонстрирована на примере изучения меченого миоглобина.²⁷ Согласно данным рентгеноструктурного анализа N-концевой участок белка представляет собой α -спираль А, включающую остатки 3–18 (рис. 4) и ориентированную таким образом, что часть поверхности обращена наружу, а другая часть находится в «тени», образованной контактом спирали А со спиралью G и H и соединяющим их участком цепи.²⁸ Распределение метки в N-концевом участке белка (аминокислотные остатки 1–20) свидетельствует о том, что метка включается только в аминокислотные остатки, обращенные наружу, а не в остатки, расположенные в области контакта и недоступные для трития. При сопоставлении величин включения метки с площадями доступной поверхности этих же остатков, рассчитанными по методу Ли и Ричардса из данных рентгеноструктурного анализа,²⁹ наблюдалась достаточно хорошая корреляция. Этот эксперимент подтвердил ранее наблюдавшуюся на пептидах зависимость включения метки от про-

пространственной структуры и предопределил возможность создания нового экспериментального метода изучения структуры и топографии доступной поверхности макромолекул и надмолекулярных систем — метод тритиевой планиграфии.

III. Исследование доступной поверхности белков. Границы применимости метода

Взаимодействие полимерных молекул осуществляется за счет групп атомов, локализованных на их поверхности. Предложены разные способы описания поверхности (рис. 5). Среди них определение поверхности макромолекулы, доступной для молекул воды, имеет особое значение, поскольку последняя играет определяющую роль в формировании, стабилизации и функционировании нативной структуры биополимера. Для обозначения этой поверхности используется специальный термин — «доступная поверхность», — введенный Ли и Ричардсом.²⁹ Этим термином обозначают поверхность, на которой располагаются центры сферической тестирующей частицы (пробы) с радиусом 1.4 Å (которой аппроксимируют молекулу воды), находящейся в контакте с ван-дер-ваальсовой поверхностью макромолекулы. При этом сама макромолекула представляется совокупностью атомов, аппроксимируемых ван-дер-ваальсовыми сферами, координаты центра которых определяются с помощью рентгеноструктурного анализа высокого разрешения (1–2 Å). С целью количественного описания доступной поверхности Ли и Ричардсом был разработан алгоритм расчета и определены площади доступной поверхности трех глобулярных белков: лизоцима, рибонуклеазы А и миоглобина.²⁹ Впоследствии такие расчеты были проведены для ряда других глобулярных белков, пространственная структура которых определена с достаточно высоким разрешением.

Исключительная функциональная важность поверхности макромолекулы, а также ее связь с характеристиками пространственной структуры инициировали большое число работ, в основном теоретического характера, в которых анализировались различные аспекты связи ее величины (площади), состава и рельефа с объемом глобулы, молекулярной массой белка, плотностью его упаковки и другими параметрами пространственной структуры (см., например, работы^{31–36}).

Для анализа поверхности макромолекул в последние годы широко применяется молекулярная картография, которая дает возможность одновременно «видеть» почти всю поверхность белка.³⁷ Используя такие карты, Барлоу и Торнтон изучили распределение заряженных групп,³⁸ а Фаннинг с соавт.³⁹ и Новотный с соавт.⁴⁰ — топографию поверхности белков с целью локализации антигенных центров.

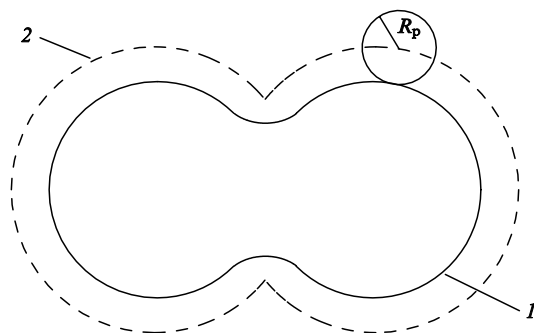


Рис. 5. Описание «поверхности» при тестировании сферической пробой с радиусом R_p на примере двухцентровой системы.³⁰
1 — контактная поверхность, 2 — доступная поверхность

Анализ рельефа поверхности возможен при наложении друг на друга трех различного вида карт.⁴¹ Определение природы доступной поверхности позволило однозначно интерпретировать гидрофобные свойства белков, которые рассчитывались только на основании аминокислотного состава. Представление о доступной поверхности оказалось весьма плодотворным при построении моделей самоорганизации полипептидной цепи.^{42–44}

Не умаляя ценности вычислительных методов определения доступной поверхности, заметим, однако, что все расчеты базируются на данных рентгеноструктурного анализа высокого разрешения. По всей видимости, в настоящее время метод тритиевой планиграфии дает наиболее полную информацию о доступной поверхности объекта. Выше говорилось, что метод основан на определении стерической доступности углеводородных групп (CH , CH_2 и CH_3) всех составляющих звеньев (в случае белков — это аминокислотные остатки) исследуемого объекта и дает информацию о его поверхности. Можно было ожидать, что между удельной радиоактивностью (A) и площадью доступной поверхности, рассчитанной по алгоритму Ли и Ричардса (S), должна существовать простая связь: $A = kS$, где k — коэффициент вероятности включения метки в остаток аминокислоты данного типа, нормированный на площадь доступной поверхности. На модельных белках с известной пространственной структурой было показано, что эта зависимость и в самом деле имеет место для большинства остатков.^{27, 45} Получаемые при этом данные, как правило, соотносились с результатами расчета доступной поверхности по алгоритму Ли и Ричардса.²⁹ Однако отмечались и отклонения, которые были связаны с особенностями механизма введения метки, а также с разницей в размерах атома трития и молекулы воды. Для устранения этих противоречий была предложена модель, описывающая доступность фрагментов объекта для атомов трития в предположении, что любой акт рассеяния приводит к потере реакционной способности.⁴⁶ Расчет по этой модели для 20 N-концевых остатков миоглобина дал лучшее соответствие с экспериментальными данными, опубликованными ранее в работе²⁷. Эффективный радиус атома трития, как и ожидалось, оказался меньше радиуса, принимаемого для молекулы воды, и составил 1.1 Å.

Следует иметь в виду, что определяемая методом тритиевой планиграфии поверхность в принципе отличается от доступной поверхности в общепринятом значении этого термина. В доступную для включения метки поверхность не входят атомы, не связанные непосредственно с атомами водорода (в белках — это атомы кислорода карбонильной группы $=\text{C}=\text{O}$, в дисульфидных связях и метионине — атомы серы), а также группы, из которых включившаяся метка легко удаляется в результате обмена с водой (группы $-\text{OH}$, $-\text{SH}$, $-\text{NH}_2$, $=\text{NH}$, $-\text{COOH}$). Не определяются также и фрагменты, стерически недоступные для реакций с падающими по прямолинейной траектории атомами трития. В результате на поверхности, определяемой методом тритиевой планиграфии, имеются разрывы, приходящиеся на участки, содержащие перечисленные выше атомы и группы атомов, в то время как поверхность, рассчитанная по алгоритму Ли и Ричардса, является непрерывной.

Возникает вопрос, в какой мере и в каких пределах возможно соотношение данных тритиевой планиграфии с расчетом доступной поверхности для «скользящей» пробы. Для ответа на него следовало определить радиус пробы, аппроксимирующей атом трития, при котором расчет по алгоритму «обкатки» ван-дер-ваальсовой поверхности наилучшим образом описывал бы эксперимент по включению метки, а также оценить границы, в которых эти данные могут быть экстраполированы на тестирующие пробы с другими размерами (радиусами). Такая работа была проведена с модельным белком лизоцимом. Для него имеются данные рентгеноструктурного анализа высокого разрешения и экс-

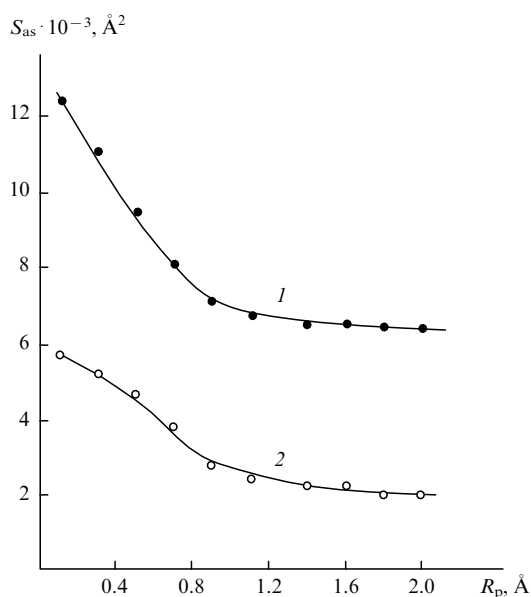


Рис. 6. Зависимость площади доступной поверхности глобулы лизоцима от радиуса тестирующей пробы (R_p). a — доступная поверхность глобулы (S_{as}^{Σ}), b — доступная поверхность углеводородных фрагментов (S_{as}^{CH})

периментально получен профиль доступности аминокислот для введения тритиевой метки.⁴⁷

По несколько измененному (по сравнению с предложенным Ли и Ричардсом) алгоритму был проведен расчет площади доступной поверхности белка для проб с радиусами от 0.1 до 2.0 и 10.0 Å для каждого аминокислотного остатка и для глобулы белка в целом, причем отдельно для всего остатка, включая и «лабильные» водородсодержащие группы (S_{as}^{Σ}) и только для углеводородного фрагмента (S_{as}^{CH}) аминокислоты. На рис. 6 представлена зависимость пло-

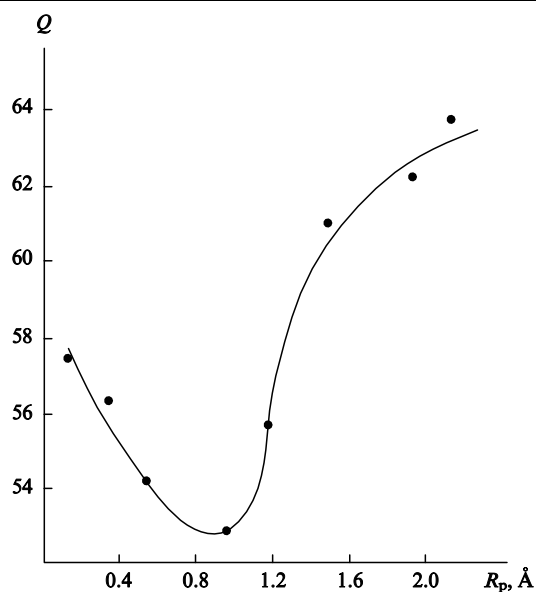


Рис. 7. Функция «невязки» Q , характеризующая расхождение расчетных и экспериментальных данных для тестирующих проб с разными радиусами. Минимум функции соответствует эффективной величине радиуса атома трития $R = 0.9$ Å

щади доступной поверхности глобулы белка от радиуса тестирующей пробы. Видно, что в области малых радиусов проб (от 0.1 до 1.0 Å) площадь доступной поверхности резко снижается (на $\sim 40\%$) при увеличении радиуса, что связано со сглаживанием рельефа поверхности. Начиная с радиуса пробы 1.0 Å, значение S_{as}^{Σ} остается практически постоянным и лишь для очень больших проб (10 Å) вновь увеличивается из-за увеличения радиуса траектории «скольжения». Для пробы с радиусом 1.4 Å (молекула воды) рассчитанная величина S_{as}^{Σ} составляет 6510 Å^2 , что близко к величине 6710 Å^2 , полученной для лизоцима Ли и Ричардсом.²⁹ Наилучшее соответствие экспериментальных и расчетных данных достигается при аппроксимации размеров атома трития сферой с радиусом 0.9 Å (рис. 7).

На рис. 8 представлены экспериментальный и рассчитанный профили доступности полипептидной цепи белка. Данные по включению метки представлены в виде отношения A/K , эквивалентного площади доступной поверхности (в Å^2). Видно, что в целом между обоими распределениями наблюдается достаточно хорошая корреляция. Расчеты доступности для проб с разными радиусами показали, что данные, полученные для атома трития с радиусом 0.9 Å, могут быть достаточно надежно экстраполированы на пробы с радиусом вплоть до 2 Å для остатков аминокислот с высокой ($> 50\%$) и

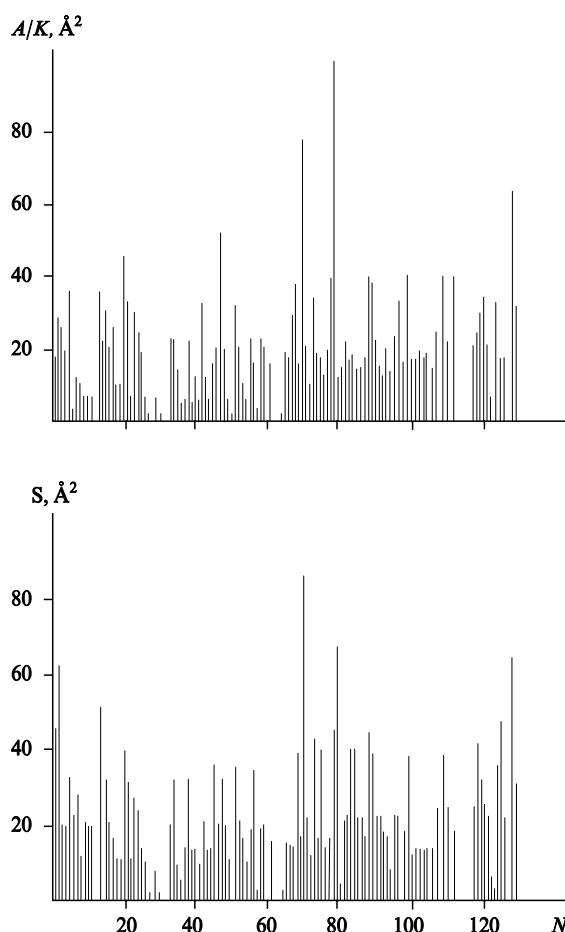


Рис. 8. Профиль доступности полипептидной цепи лизоцима, полученный экспериментально по введению метки (a) и рассчитанный для пробы с радиусом 0.9 Å (b).

A/K — удельная активность аминокислотных остатков, нормированная на коэффициенты вероятности включения метки, S — площадь доступной поверхности в Å^2 , N — номер аминокислотного остатка в последовательности белка

средней (20–50%) степенью доступности, если принять в качестве меры доступности отношение площадей остатка (в составе молекулы белка) и гипотетической полностью развернутой полипептидной цепи для пробы с радиусом 1.4 Å (моделью последней служит *транс*-пептид Ala–X–Ala). В случае малодоступных остатков (< 20%) интерпретировать данные о включении метки следует с осторожностью. Однако доля таких остатков на поверхности макромолекулы невелика, и большой погрешности в конечный результат они внести не могут. При определении суммарной площади белка их вклад полностью нивелируется.

В этой же работе были определены коэффициенты, позволяющие переходить от площади доступной поверхности углеводородного фрагмента к полной площади остатка ($S_a^{CH} = \gamma S_{as}^{\Sigma}$). Оказалось, что значение γ зависит не только от природы остатка (что естественно), но и от степени его доступности в составе третичной структуры. Однако на уровне целой глобулы эта величина в широком диапазоне значений радиусов проб остается постоянной и составляет 0.4 ± 0.06 . Заметим, что согласно Чотиа,⁸¹ доля площади доступной поверхности, образованной неполярными атомами (а это в основном углеводородные фрагменты), зависит от молекулярной массы белка: уменьшается с увеличением последней. Эта доля для лизоцима в работе Ли и Ричардса²⁹ равна 0.392, что совпадает со значением, полученным в работе⁴⁷.

Гедровичем с соавт.⁵⁵ предложен подход, позволяющий провести количественные оценки суммарной (общей) площади доступной поверхности белка по величине включения метки в способные обмениваться группы аминокислотных остатков и в молекулы воды, прочно связанные с поверхностью (гидратная оболочка). Авторы использовали ряд белков с известной пространственной структурой (лизоцим, рибонуклеаза S, миоглобин, папаин, субтилизин и α -химотрипсин) и построили в координатах $\lg I$ – $\lg S$ линейную зависимость. Полученную прямую можно рассматривать как калибровочную и с ее помощью определять площадь доступной поверхности глобулярных белков с неизвестной структурой (рис. 9). Такого рода расчет был проведен для глобулярного белка парвальбумина III щуки. Найдено, что площадь доступной поверхности белка составляет $5700 \pm 900 \text{ \AA}^2$. Использование эмпирической зависимости величины площади доступной поверхности от молекулярной массы белка дает значение $5800 \text{ \AA}^2$ (см.³⁴).

Результаты экспериментов с белками, пространственные структуры которых определены с помощью рентгеноструктурного анализа с высоким разрешением, позволили перейти

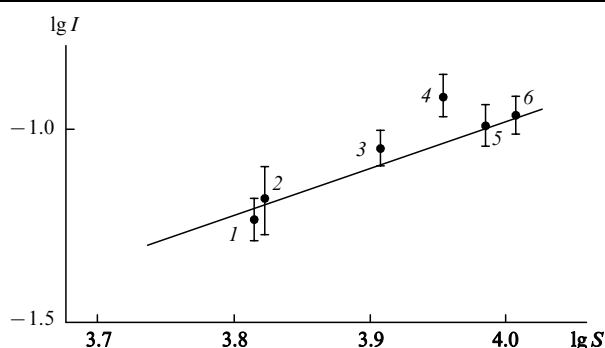


Рис. 9. Зависимость приведенной радиоактивности от площади доступной поверхности белков.

1 — лизоцим, 2 — рибонуклеаза S, 3 — миоглобин, 4 — папаин, 5 — субтилизин BNP, 6 — α -химотрипсин. Величина I включает метку в C–H-связях, лабильных группах и в прочно связанной воде, нормированную на поток атомов трития

к объектам, информация о структуре которых недостаточна или вообще отсутствует.

Так, анализ величин удельного мечения аминокислот в тотальном гидролизате белка позволил сделать выводы о ряде параметров периферической области молекулы сывороточного альбумина человека,^{45,49} для которого данные рентгеноструктурного анализа с разрешением 6 Å не позволяли провести расчет.⁴⁸ Оказалось, что по сравнению с лизоцимом доступная поверхность альбумина обогащена остатками гидрофобных аминокислот, на долю которых приходится 63% от суммы всех аминокислот поверхности (в случае лизоцима — 18%). Суммирование доступных площадей поверхности аминокислот с учетом числа остатков каждого типа в белке дает для общей площади глобулы $S_a^{CH} = 19900 \text{ \AA}^2$ (см.⁴⁵). С помощью отношения S_a^{CH}/S_{as}^{Σ} , которое для лизоцима составляет 0.4, была найдена общая площадь белка, равному $49000 \text{ \AA}^2$. Использование эмпирической зависимости площади доступной поверхности полностью развернутой полипептидной цепи от молекулярной массы привело к значению коэффициента свернутости полипептидной цепи, равный 0.48. При аппроксимации глобулы альбумина эллипсоидом вращения с осями 140 : 40 : 40 Å (см.⁵⁰) удалось определить такой важный параметр структуры, как коэффициент «шероховатости» нативного белка, который оказался равным 2.7. Для молекулы лизоцима соответствующие коэффициенты свернутости и шероховатости составил 0.68 и 1.7. Отсюда может следовать вывод об относительно более низкой степени компактности упаковки полипептидной цепи сывороточного альбумина и о большей изрезанности рельефа его поверхности по сравнению с лизоцимом, что хорошо согласуется с известными физико-химическими свойствами этого белка, и прежде всего, с его ярко выраженными гидрофобными свойствами.⁵¹ Ажурность пространственной структуры подтверждается многочисленными данными о высокой способности альбумина связывать низкомолекулярные гидрофобные вещества, например жирные кислоты, и хорошо согласуется с представлением о наличии в молекуле белка нескольких гидрофобных полостей.⁵² Вывод о рыхлости упаковки глобулы альбумина кор-релирует также с представлениями о гибкости этой молекулы, ее способности к флуктуациям объема.

Сравнительному изучению доступных поверхностей для введения тритиевой метки двух ключевых ферментов биосинтеза белка — аминоксил-тРНК-синтетаз — посвящены работы Бобковой с соавт.^{53,54} Оба фермента (фенилаланил-тРНК-синтетаза из *E. coli* и *Thermus thermophilus*) имеют сходные четвертичные структуры. На структурное подобие по крайней мере областей активных центров этих ферментов указывает то, что термофильный фермент катализировал реакцию аминокислотирования тРНК из *E. coli*, а фермент из *E. coli* способен катализировать аминокислотирование термофильной тРНК. Для фермента из *Thermus thermophilus* получены кристаллы, пригодные для изучения методом рентгеноструктурного анализа, в то время как попытки получения кристаллов фенилаланил-тРНК-синтетаза из *E. coli* не увенчались успехом. В этой связи метод тритиевой планиграфии — один из немногих возможных способов исследования структуры поверхности фермента из *E. coli* и сравнения ее с поверхностью аналогичного термофильного белка. На рис. 10 представлены диаграммы площадей поверхности аминокислотных остатков двух белков, полученные из данных по удельным активностям аминокислот в тотальных гидролизатах белков. Можно видеть довольно высокую степень гидрофобности поверхности белков (60% для фермента из *E. coli* и 67% для термофильного белка). Сопоставление данных о степени гидрофобности поверхностей с общей суммой гидрофобных остатков в обоих белках позволяет утверждать, что это распределение для рассматриваемых мезофильной и термофильной синте-

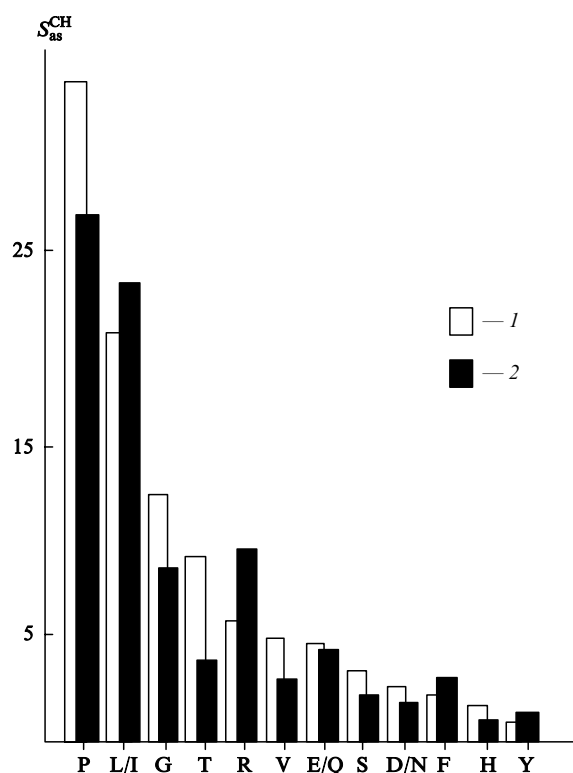


Рис. 10. Аминокислотный состав доступной поверхности фенилаланил-тРНК-синтетаз из *E. coli* (1) и *Thermus thermophilus* (2), выраженный в процентах от общей площади глобулы

таз примерно одинаково. Эффект пропорционального увеличения гидрофобности на поверхности и во внутренней части глобулы белка при переходе от мезофильного фермента к термофильному, как нам кажется, весьма интересен. Однако более важной была возможность выявить разницу в аминокислотных остатках, локализованных на поверхности белка. Наблюдаемое при переходе от мезофильного фермента к термофильному возрастание доступности остатков аргинина, входящего в состав нуклеотид-узнающих остатков аминоксил-тРНК-синтетаз, позволило авторам работ^{53, 54} высказать гипотезу, объясняющую возрастание экспонированности на поверхности глобулы заряженных остатков стремлением термофильной тРНК-синтетазы компенсировать дестабилизирующее воздействие высокой температуры путем введения дополнительных электростатических взаимодействий с субстратом.

Исследования подобного типа были ранее проведены с Fe- и MoFe-белками нитрогеназы азотобактера.¹⁰ Мы не будем останавливаться на результатах подобных исследований, отметим только, что они лишней раз свидетельствуют о возможности получения достаточно ценной структурной информации из сравнительно простого эксперимента.

IV. Конформационные переходы в белках

Очевидно, что любые изменения пространственной структуры макромолекулы должны сказываться на топографии ее доступной поверхности. Это обстоятельство делает весьма перспективным использование метода тритиевой планиграфии для изучения конформационных переходов. В работах Волынской с соавт.^{56, 57} это показано на примере изучения денатурации лизоцима под действием 8 М мочевины с восстановлением дисульфидных связей. Оказалось, что распределение метки по аминокислотным остаткам в денатурированной форме существенно отличается от нативного и

приближается к статистическому. Последнее можно было рассчитать, используя в качестве модели трипептиды Ala—X—Ala (см.²⁹) с учетом коэффициентов вероятности включения метки. Эта модель, естественно, может рассматриваться только как грубое приближение. При анализе реальной структуры денатурированного состояния необходимо учитывать взаимное экранирование остатков ближайшими по цепи соседями, а также возможную ориентацию полипептидной цепи на поверхности мишени. Тем не менее рассчитанное и экспериментальное распределения метки в полностью денатурированной форме достаточно схожи.

Отметим, что под действием только 8 М мочевины без разрыва S—S-связей образуется состояние, обладающее определенной структурированностью. Для него характерно увеличение по сравнению с нативным доступности остатков гидрофобных аминокислот при малом изменении доступности гидрофильных остатков. По мнению авторов работ^{56, 57} это свидетельствует о нарушении гидрофобных контактов при сохранении в целом глобулярной структуры, что подтверждается независимыми данными по измерению вязкости растворов белка в присутствии 8 М мочевины, спектрами кругового дихроизма (КД) и дисперсии оптического вращения.^{58, 59}

Высокая чувствительность метода тритиевой планиграфии позволила обнаружить промежуточные состояния белка, возникающие при слабых денатурирующих воздействиях и не фиксируемые традиционными методами.⁵⁶ Одно из них индуцируется добавлением 1 М хлористого лития и характеризуется существенно меньшей по сравнению с нативной конформацией доступностью остатков аминокислот полярной природы при практически неизменной доступности гидрофобных остатков. Такой переход можно трактовать как «сжатие» глобулы. Другое состояние, напротив, характеризуется увеличением доступности всех типов остатков аминокислот и индуцируется добавлением таких денатурантов, как 1 М мочевина и гуанидин·HCl. Этот переход подобен разворачиванию глобулы при сохранении всех остальных структурных характеристик (вязкость, спектры КД и др.). По всей видимости, в этом случае мы имеем дело с некоторым «разрыхлением» упаковки элементов вторичной структуры без их разрушения и без изменения общей архитектуры глобулы. Такого рода промежуточные состояния были обнаружены и в рибонуклеазе.⁶⁰

Наблюдаемые конформационные переходы лизоцима удалось сопоставить с изменением ферментативной активности. Используя в качестве теста скорость лизиса оболочек *Micrococcus lysodecticus*, удалось показать, что «сжатие» и «разрыхление» глобулы лизоцима приводит к уменьшению ферментативной активности, причем эффект «сжатия» сказывается более резко. Аналогичные закономерности были обнаружены и для рибонуклеазы А.⁶⁰ Низкие концентрации солей (0.1–0.2 М) вызывали сжатие глобулы белка, которое сопровождалось быстрым падением ферментативной активности. Интересно, что при этом существенно снижается и внутримолекулярная подвижность белка, регистрируемая по среднеквадратичной амплитуде смещения $\langle X^2 \rangle$ по данным рэлеевского рассеяния мёссбауэровского излучения. В отличие от солей, низкие концентрации мочевины вызывали разрыхление глобулы белка, которое также сопровождалось снижением ферментативной активности. Полная потеря ферментативной активности в этом случае наблюдалась однако лишь в 8 М мочевины.

Особо хотелось бы остановиться на результатах изучения методом тритиевой планиграфии pH-зависимых конформационных переходов в белках. Последние часто играют важную роль в функционировании макромолекул, а изменение pH среды в этих случаях является фактором, регулирующим их биологическую активность.

Сывороточный альбумин человека — один из основных белков плазмы крови, функция которого связана, главным образом, с транспортом различного рода биологически активных веществ. Для него известно несколько зависящих от pH конформационных переходов. Наиболее ярко выраженными являются N—F- и N—B-переходы, происходящие соответственно в кислой (pH 3.5–4.5) и щелочной (pH 7.0–9.0) средах.^{61, 62} Несмотря на многочисленные исследования, о природе этих структурных переходов известно мало.

Сравнительное изучение доступной поверхности белка в N-, F- и B-формах методом тритиевой планиграфии позволило получить о них определенную структурную информацию.^{63, 64} Оказалось, что при N—F-переходе суммарная доступная поверхность белка увеличивается в 2 раза, что хорошо согласуется с изменением размеров молекулы, установленным методом малоуглового рассеяния и по измерению вязкости.^{65, 66} О расширении глобулы в F-форме свидетельствует увеличение отношения осевых размеров молекулы от 3.3 до 5.8 (см.⁶⁷), а также увеличение гидратации молекулы на 50%.⁶⁸ В F-форме белка гидрофобные остатки более доступны мечению, чем в N-форме. Этот факт коррелирует с большей гидрофобностью белка в F-форме по сравнению с нативной. Анализ распределения метки в B-форме белка показывает более высокую доступность аминокислотных остатков по сравнению с нативным состоянием, однако масштаб этого увеличения и количество изменившихся свою доступность остатков существенно меньше, чем при N—F-переходе.

К сожалению, во всех упомянутых выше работах определялось включение метки в сумму аминокислот разных типов и не анализировалось распределение трития по цепи белка. Это позволяло фиксировать сам факт конформационного перехода и получать лишь самые общие характеристики образующихся состояний, но мало что давало для выяснения детальной структуры.

Интересные результаты удалось получить при изучении pH-зависимых конформационных переходов в гемагглютинине — одном из функционально важных белков оболочки вируса гриппа. В настоящее время можно считать твердо установленным, что индуцируемый изменением pH процесс слияния вирусной и эндосомальной мембран (ключевого события в механизме инфицирования клетки) осуществляется с участием именно этого белка.⁶⁹ Однако, несмотря на разносторонние исследования, в том числе с помощью биохимических, биофизических, генетических и иммунологических методов,⁷⁰ молекулярные механизмы и интермедиатные состояния слияния мембран все еще остаются неизвестными. Глушаковой с соавт.⁷¹ была предложена изящная экспериментальная модель, позволяющая изучать pH-зависимые конформационные изменения белка, приводящие к его взаимодействию с мембраной.⁷¹

Модель представляла собой липосомы со встроенным в липидную мембрану ионофором нигерицином, во внутреннем объеме которых находился гемагглютинин. Понижение pH внешней среды приводило к соответствующему изменению pH внутри липосом и индуцировало переход белка в конформацию, которая может взаимодействовать с липосомальной мембраной. Для визуализации внешней поверхности липосом использовали мечение тритием. Сравнение значений удельного мечения белка и распределения радиоактивности в аминокислотах в контрольных (при нейтральном pH) и экспериментальных (при pH слияния) образцах липосом позволяло понять характер взаимодействия белок — мембрана. Оказалось, что в кислой среде увеличивается удельная активность белка (активности гидрофобных аминокислот Ile, Phe и Tyr увеличиваются в 2–3 раза). Это указывает на внедрение молекулы белка (или ее части) в мембрану, а возможно, даже и экспонирование ее части на внешней поверхности, и подтверждает широко распространенную концепцию о том, что гидрофобный N-концевой

пептид малой субъединицы белка (так называемый пептид слияния) осуществляет взаимодействие мембран. Анализ внутримолекулярного распределения метки по цепи белка из контрольных и экспериментальных липосом, безусловно, позволит понять детали картины липид-белкового взаимодействия. Модель можно считать универсальной для изучения любых липид-белковых взаимодействий, так как внутри липосомы может быть включен любой белок и даже целый вирус.

Методом тритиевой планиграфии было изучено и pH-зависимое конформационное изменение гемагглютинина в составе целого вируса, приводящее к его инактивации. До сих пор делались попытки оценить изменение конформации гемагглютинина после кислой преинкубации вируса по изменению антигенных характеристик белка, его чувствительности к протеазам и прежде всего по изменению экспонированности его «сливающего пептида». Попытка изучить это явление с помощью метода тритиевой планиграфии предпринята Ксенофоновым с соавт.⁷² Удалось показать, что, во-первых, малая субъединица гемагглютинина в вирусе, инактивированном в кислой среде, сильно экспонируется, о чем свидетельствует почти двукратное увеличение ее удельного мечения по сравнению с активным вирусом; во-вторых, инактивация в кислой среде мишени без мембраны не приводит к экспонированности «пептида слияния». Эти данные позволили авторам предложить свою модель конформации гемагглютинина в составе неактивного вируса.

V. Доступная поверхность и внутримолекулярная динамика белков

Имеется достаточное число работ, указывающих на связь внутримолекулярной динамики биополимеров с их функциональными свойствами.⁷³ Очевиден факт, что внутримолекулярная подвижность, во всяком случае крупномасштабная сегментальная подвижность, должна проявляться в структуре доступной поверхности. Однако до настоящего времени опубликовано лишь несколько расчетных работ, в которых эта связь продемонстрирована. В частности, Левитом^{74, 75} с помощью компьютерного моделирования показано, что доступная площадь поверхности некоторых аминокислотных остатков при учете динамики может отличаться от статической на 50–60%. Какие-либо прямые экспериментальные данные о связи доступной поверхности с динамическими параметрами до настоящего времени не получены.

Известно, что внутримолекулярная подвижность биополимеров существенным образом зависит от двух параметров — влажности образца и температуры.^{76, 77} Это открывает возможности исследования связи доступной поверхности и молекулярной динамики методом тритиевой планиграфии путем анализа распределения метки при разных температурах мишени и фиксированной влажности (или наоборот).

Попытка такого рода была предпринята в работе⁷⁸ Выбрав в качестве модельного объекта белок лизоцим, авторы определили температурную зависимость включения метки как в целый белок, так и в аминокислотные остатки каждого типа. Температуру мишени варьировали от 77 К до комнатной.⁷⁹ На рис. 11 приведена температурная зависимость удельной радиоактивности белка, нормированной на поток атомов трития (*A*) в интервале 77–293 К. На кривой можно выделить два участка: уменьшение включения метки в области 77–163 К и увеличение в интервале 163–293 К. Наблюдаемое увеличение уровня метки выше 163 К не может быть объяснено температурной зависимостью константы скорости реакции, приводящей к включению метки, так как температура падающих на поверхность мишени горячих атомов трития (2000 К) много выше температуры образца. Повышение температуры от 77 до 293 К может дать увеличение включения метки не более чем в 1.2 раза, однако наблюдался рост активности более чем в 3 раза. По данным

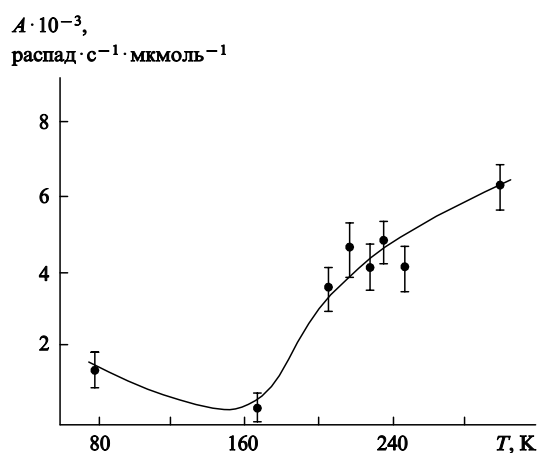


Рис. 11. Температурная зависимость включения метки в лизоцим. A — радиоактивность белка, нормированная на активность монитора

рэлеевского рассеяния мёссбауэровского излучения и с помощью парамагнитных зондов было найдено, что в области температур 170–190 K происходит «размораживание» внутримолекулярной подвижности.^{76, 80} Это хорошо коррелирует с обнаруженным в работе⁷⁸ увеличением доступности. Рост включения метки (соответственно площадь доступной поверхности) при понижении температуры от 163 до 77 K не может быть объяснен динамическими эффектами. Возможно, это связано с изменением пространственной структуры белка вследствие замерзания внутренней, прочно связанной с белком воды, что приводит к нарушению баланса сил, стабилизирующих пространственную структуру, и ее «разрыхлению».

Зависимость вероятности включения метки от температуры изучалась также на уровне отдельных аминокислотных остатков. По характеру этой зависимости все остатки условно были разделены на три группы. Большая часть остатков первой группы, доступность которых увеличивается в интервале 170–293 K, находится вне участков повышенной подвижности полипептидной цепи. Они, как правило, располагаются на N- и C-концах структурированных областей, вблизи мест поворота полипептидной цепи. Доступность остатков второго типа меньше и не зависит от температуры в этом интервале. Они, как правило, находятся в середине α -спиральных участков, в непосредственной близости к остаткам, образующим внутреннюю область белковой глобулы. И, наконец, 70% остатков, образующих участки повышенной подвижности, — это остатки третьего типа. Их доступность мало изменяется в интервале 160–270 K и резко возрастает при 293 K.

К сожалению, полученные данные, как и рассмотренные выше результаты исследования конформационных переходов, являются усредненными по типам аминокислот и не дают возможности получить детальную картину. По сути сделана первая попытка показать, что доступная поверхность является функцией молекулярной динамики и что эта связь может быть исследована с помощью данного метода.

VI. Моделирование пространственной структуры белков

Трудоемкость и ряд принципиальных ограничений методов рентгеноструктурного анализа и ЯМР, о которых мы говорили выше, существенно тормозят исследование пространственных структур макромолекул. Это стимулировало многочисленные попытки теоретических предсказаний тре-

тичной структуры белков на основе данных о первичной структуре, статистического и эволюционного анализа объектов с известной структурой и т.п. (см., например, последние работы^{82–85}). Однако с сожалением приходится констатировать, что в отличие от методов предсказания вторичной структуры, теоретическое моделирование пространственной структуры, даже на уровне предсказания общего хода полипептидной цепи, все еще остается неразрешимой проблемой.

По всей видимости, наиболее перспективными следует считать работы, в которых наряду с теоретическим предсказанием, используются параметры, получаемые непосредственно из эксперимента. В качестве таковых могут служить данные о топографии доступной поверхности. В самом деле, так как между пространственной структурой и доступной поверхностью существует однозначная связь и последняя может быть рассчитана по координатам атомов, то правомочна постановка обратной задачи, а именно, построение модели пространственной структуры молекулы белка по доступности составляющих ее аминокислотных остатков. В общем виде возможен следующий алгоритм решения:

- 1) определить профиль доступности аминокислотных остатков молекулы белка мечению тритием;
- 2) предсказать элементы вторичной структуры белка, используя уже разработанные теоретические подходы;
- 3) найти способ упаковки друг относительно друга элементов вторичной структуры, обеспечивающий поверхностную локализацию на модели доступных для атомов трития фрагментов цепи и, наоборот, нахождение недоступных участков внутри модели глобулы.

Моделирование существенно облегчает любая дополнительная информация, например, данные о числе и локализации дисульфидных связей, о местах связывания лигандов, субстратов, металлов, о локализации отдельных функциональных групп, данные антигенного картирования. Все это в совокупности может оказаться достаточным для выбора оптимального пути укладки элементов вторичной структуры на всех стадиях сборки.

Первая попытка построения модели пространственной упаковки полипептидной цепи была предпринята для белка оболочки вируса табачной мозаики.⁸⁶ Простота объекта, содержащего всего четыре α -спиральных участка, обусловила легкость построения трехмерной модели, которая хорошо совпала с данными рентгеноструктурного анализа.⁸⁷

Позже возможность такого подхода была апробирована на примере глобулярного белка парвальбумина щуки, относящегося к семейству Ca^{2+} -связывающих белков.⁸⁸ Это сравнительно небольшой белок, содержащий 108 аминокислот. Для расчета элементов вторичной структуры были использованы два широко распространенных метода — Чоу, Фасмана⁸⁹ и Лима⁹⁰. Предсказанные пять α -спиралей включали 69 аминокислот, что соответствовало 64% от всей суммы аминокислот. Это безусловно, облегчало моделирование. При построении моделей трехмерной структуры белка был использован метод Птицына и Рашина,⁹¹ который включает, как наиболее существенную часть, поиск контактов между соседними α -спиралями (α -спирали при этом аппроксимировались жесткими цилиндрами). Укладку полипептидной цепи проводили путем последовательного поиска контактов сначала между внутренними спиралями C и D (внутренними по степени их доступности мечению тритием), а затем последовательно присоединяли к образовавшемуся комплексу спирали E, F, B и A. При выборе относительной ориентации спиралей помогало знание участков связывания кальция, накладывающее определенные ограничения на расположение друг относительно друга остатков, координирующих ионы кальция.⁹² Модель пространственной структуры парвальбумина щуки (рис. 12) во многом оказалась схожей со структурой гомологичного белка парвальбумина карпа.⁹³

Общность структур этих двух белков проявляется и в сходстве топографий их доступных поверхностей, что пока-

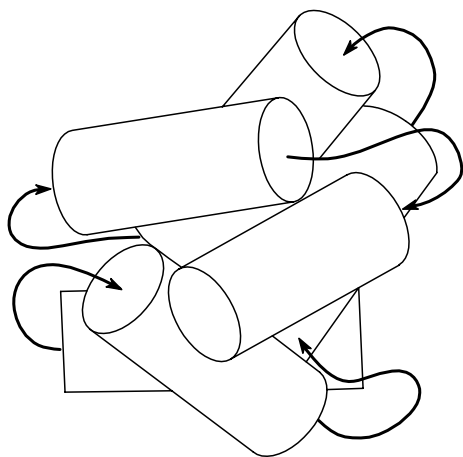


Рис. 12. Модель пространственной структуры парвальбумина III шуки

зало сравнение расчетных данных для парвальбумина карпа с экспериментальными данными для парвальбумина шуки.⁸⁷

Приведенные в настоящем разделе результаты еще нельзя рассматривать как законченную концепцию, позволяющую на основе совокупности экспериментальных данных о топографии доступной поверхности и теоретического предсказания элементов вторичной структуры получать трехмерные модели белков. Однако есть все основания надеяться, что дальнейшая разработка этого подхода и дополнение его необходимыми элементами компьютерного моделирования дадут в руки исследователей новый и достаточно результативный способ получения информации о пространственной структуре макромолекул.

VII. Пространственная организация надмолекулярных систем

Продemonстрированная выше на примере белков связь между распределением метки и структурой доступной поверхности еще более ярко проявляется при исследовании надмолекулярных объектов, в которых эффекты взаимного экранирования компонентов имеют существенное значение. В зависимости от постановки эксперимента удавалось получить информацию как о самых общих характеристиках структуры (общей архитектуре комплекса, расположении компонентов системы в пространстве друг относительно друга, локализации поверхностей контакта и т.д.), так и о ее деталях, вплоть до определения доступности отдельных мономерных звеньев белка в составе сложной системы.

По всей видимости, первой попыткой применить метод тритиевой планиграфии для исследования пространственной структуры сложного надмолекулярного объекта следует считать тритирование рибосомы из *E. coli*. Как известно, рибосома представляет собой нуклеопротеидный комплекс, включающий две молекулы высокополимерных РНК: 16S-РНК в малой и 23S-РНК в большой субчастицах. В состав большой 50S-субчастицы входит также низкомолекулярная 5S-РНК. С 16S-РНК в малой 30S-субчастице ассоциирован 21 белок, большая субчастица содержит 32 различных белка.

Сравнение величин включения метки в белки в изолированных субчастицах рибосом 30S и 50S и в целой рибосоме 70S позволило выявить белки, экспонированные на поверхности, а также показать отсутствие белков на контактирующей поверхности субчастиц.^{24, 94–96} Молекулы РНК, как показано в отдельных экспериментах, в этих условиях сохраняют интактность и способность специфически взаимодей-

ствовать с белками.⁹⁷ Однако при обсуждении факта отсутствия белков на контактирующей поверхности рибосомальных субчастиц, нельзя исключить, что на самом деле контакт двух рибосомных субчастиц не является достаточно плотным и не препятствует включению трития в белки межсубъединичной области.

Для рибосомы была предпринята интересная, на наш взгляд, попытка определения экспонированности синтезируемой на рибосоме полипептидной цепи.^{98, 99} Существует точка зрения, что первые звенья растущего пептида располагаются в канале, геометрия которого обеспечивает сворачивание полипептидной цепи в спираль. Однако экспериментальные подходы, используемые для обоснования существования канала, связаны, как правило, с применением в качестве тест-реагентов крупных макромолекул (протеазы и антитела) к синтезируемым рибосомой белкам. Казалось, что малые размеры атома трития могут дать необходимую детальную информацию. Полученные данные по включению метки показали, что на поверхности рибосомы экспонируется полипептидная цепь длиной уже в три остатка и более. К сожалению, в данных работах использовалась искусственная поли-(У)-зависимая бесклеточная система трансляции, т.е. отсутствовала инициация трансляции в том виде, в каком она происходит при трансляции природных мРНК. Возможно, это и является причиной противоречия полученных результатов существующим представлениям о канале.

Еще один пример нуклеопротеидного комплекса, для изучения которого был использован метод тритиевой планиграфии хромосомы из фибробластов мыши.¹⁰⁰ Оказалось, что в метафазных хромосомах мечению тритием доступны как хромосомные белки, так и ДНК. Анализ включения метки в белки показал, что белки *scaffold* наиболее экспонированы, что может свидетельствовать об их нахождении на внешней поверхности метафазных хромосом.

Ряд работ посвящен применению метода тритиевой планиграфии для исследования пространственной архитектуры многосубъединичных белковых комплексов. Так, в работах^{101–102} сделана попытка определения относительной доступности белковых субъединиц в составе цитохромоксидазы и в ее комплексе с цитохромом С. Цитохромоксидаза — терминальный фермент дыхательной цепи живой клетки. Это трансмембранный белок, состоящий у высших млекопитающих из 12 различных субъединиц. Для проверки, подтверждения и возможной детализации существующей модели структурной организации субъединиц в цитохромоксидазе, а также для определения участков взаимодействия фермента с цитохромом С было проведено тритирование свободного фермента и фермента в составе комплекса. Сравнение величин удельного мечения субъединиц показало, что при образовании комплекса молекула цитохрома частично экранирует субъединицы I, II, VIc, VIIa – VIIc белка, что согласуется с данными работы¹⁰³.

Особый интерес представляет применение метода тритиевой планиграфии к исследованию мембранных структур, в частности, к изучению топографии трансмембранных белков, поскольку наличие липидного бислоя должно приводить к заметным различиям в доступности для трития экспонированных и внутримембранных участков полипептидной цепи. В самом деле, как было показано в описанных выше экспериментах с липосомами, нагруженными гемагглютинином, бислойная липидная мембрана в 10 раз ослабляет поток атомов трития.⁷² Клеточная мембрана практически полностью экранирует внутреннее содержимое клетки от проникновения атомов трития. Так, для эритроцитов отмечалось, что уровень включения метки во внутриклеточный гемоглобин более чем на два порядка ниже, чем уровень включения в свободный белок.¹⁰⁴

В качестве первого примера изучения мембранных структур методом тритиевой планиграфии следует назвать бакте-

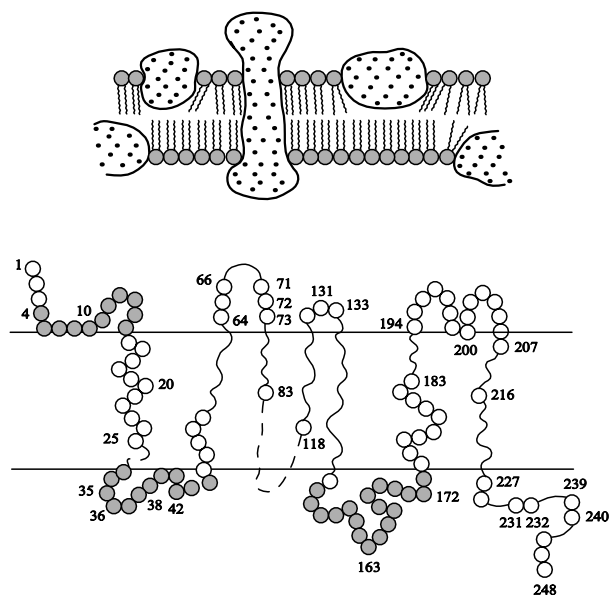


Рис. 13. Схема «укладки» полипептидной цепи бактериородопсина в мембране.

Темными кружками показаны остатки аминокислот, в которых обнаружено включение метки. Участки 25–33, 66–71, 83–118, 207–231, 232–239, 240–246 не анализировались

риородопсин.^{104–106} Это один из наиболее хорошо охарактеризованных мембранных белков, для которого в общих чертах выяснен тип пространственной организации, а также идентифицирован ряд экспонированных остатков (см., например,¹⁰⁷). Такая ситуация позволяла оценить возможности метода и при благоприятном результате получить дополнительные экспериментальные данные, необходимые для проверки и дальнейшей детализации существующих моделей укладки белка в мембране. На основании анализа включения метки в аминокислотные остатки белка в составе мембраны была предложена схема укладки (рис. 13), хорошо согласующаяся с моделью, построенной на основе теоретических предсказаний.¹⁰⁸ В результате работы удалось уточнить положения остатков триптофанов (позиции 10 и 12), которые оказались не в толще мембраны, как предполагалось ранее,^{109,110} а вблизи поверхности. Новая модель учитывает частичное экранирование фрагментов, не входящих в состав внутримембранных α -спиральных сегментов.¹¹¹

Тот факт, что внутримембранные остатки, удаленные от поверхности мембраны не менее чем на 5 Å (т.е. на величину, превышающую длину свободного пробега атомов трития), все-таки включают некоторое количество трития объясняется, по-видимому, тем, что количество липидов в пурпурной мембране (10 молекул на одну молекулу белка¹¹²) оказывается недостаточным для того, чтобы сделать внутренние участки полипептидной цепи полностью недоступными для трития.

Островским с соавт.¹¹³ было проведено тритирование интактных клеток и протопластов бактерий *Micrococcus luteus* с целью локализации компонентов мембраны (потенциальных антигенов), экспонированных на клеточной оболочке. Показано, что более 90% необменивающегося трития включается в цитоплазматическую мембрану и 98% из этого количества приходится на липиды, что открывает перспективу исследования асимметрического расположения липидов в мембране клетки. Кроме того обнаружено, что в случае протопластов тритий включается преимущественно в три мембранных белка, а в случае клеток — в один белок.

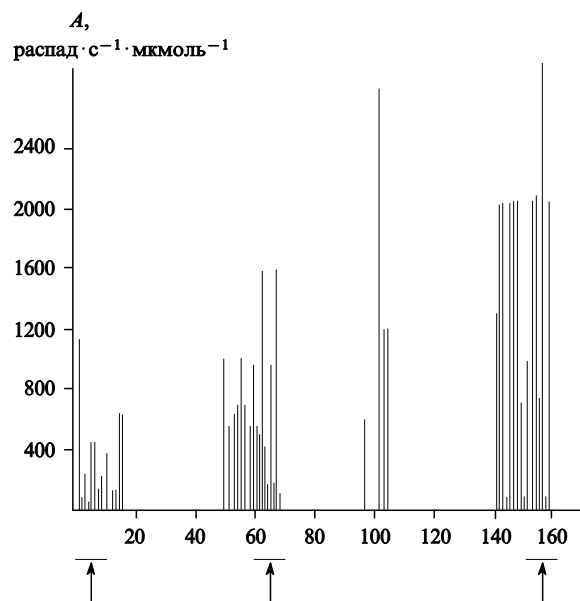


Рис. 14. Экспериментальный профиль доступности полипептидной цепи белка оболочки вируса табачной мозаики в составе вириона. Стрелками обозначены участки, являющиеся антигенными детерминантами белка в составе вируса

В большинстве рассмотренных выше работ информация о структуре надмолекулярного объекта ограничивалась определением доступности целых молекулярных компонентов (исключение — бактериородопсин). Более детальное исследование было проведено с вирусом табачной мозаики (ВТМ). Данные рентгеноструктурного анализа^{114,115} с разрешением 3.6 Å для вируса и детальная антигенная характеристика вирусного капсида¹¹⁶ свидетельствовали о том, что данный объект может служить идеальной модельной системой.

Бомбардировке тритием подвергались целые вирусные частицы.^{117–119} На рис. 14 представлено распределение метки по аминокислотным остаткам полипептидной цепи белка. Видно, что имеются достаточно протяженные области, в которых аминокислотные остатки недоступны для

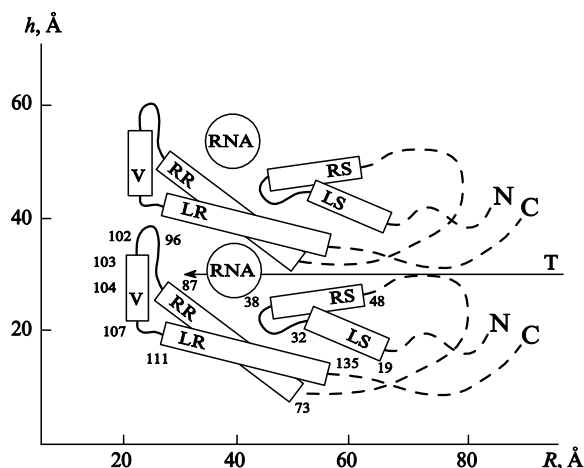


Рис. 15. Схема укладки белковых субъединиц в вирионе ВТМ, демонстрирующая возможность проникновения атомов трития во внутренние области вириона¹¹⁵

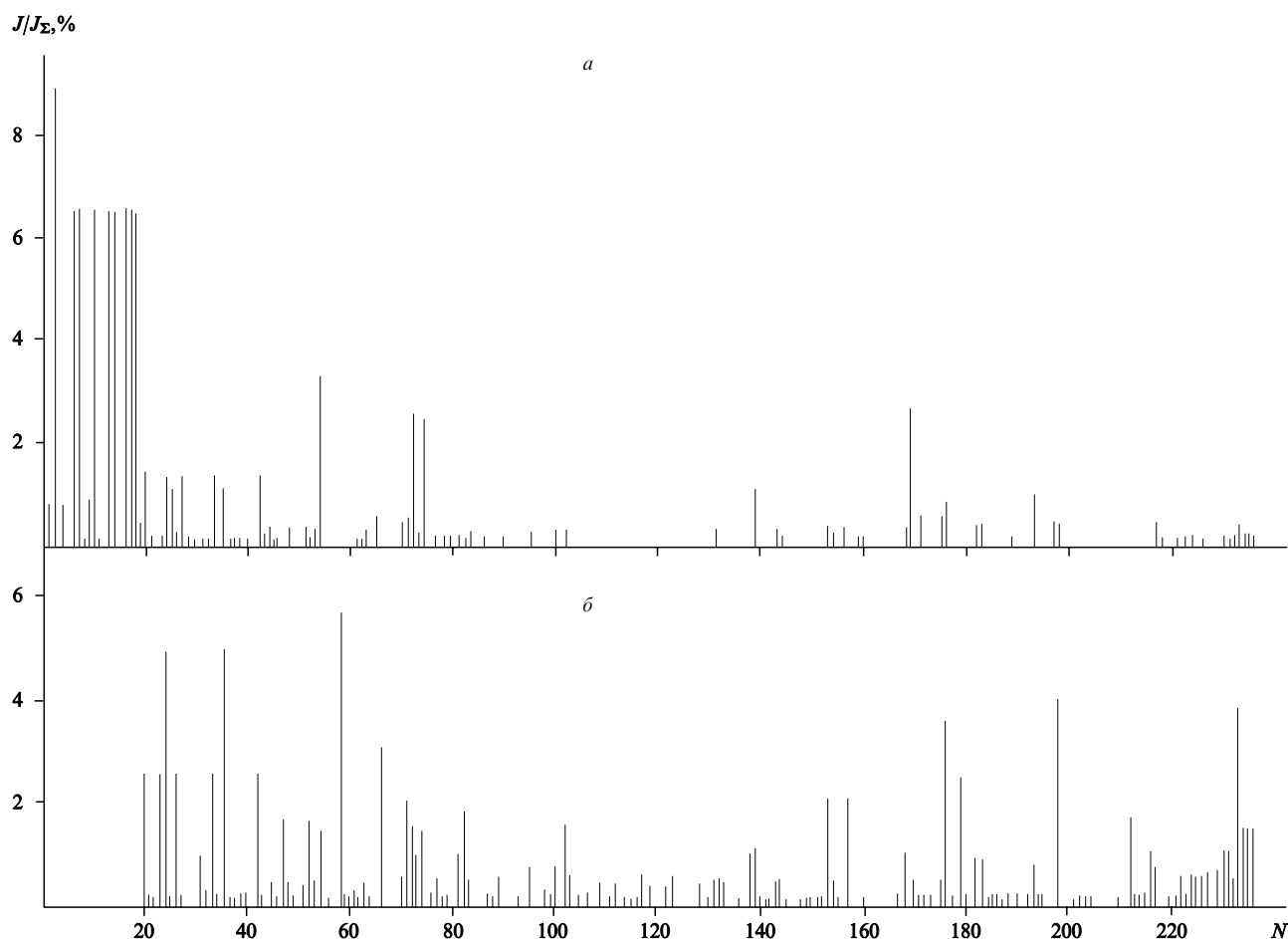


Рис. 16. Экспериментальный профиль доступности полипептидной цепи X вируса картофеля (ХВК) в нативной форме (*a*) и частично деградированной протеазами клеточного сока (*б*).

J/J_{Σ} — доля активности, приходящаяся на данный остаток аминокислоты, N — номер остатка в последовательности белка

атомов трития. На рис. 15 представлена схема укладки полипептидной цепи белка оболочки вируса. При сопоставлении результатов эксперимента по распределению метки в белке с полученными на основании этой схемы видно, что наиболее доступны мечению N- и C-концевые фрагменты белка, расположенные на внешней стороне вирусной частицы; часть недоступных для мечения участков белка попадает в область контактов между субъединицами. Неожиданным, на первый взгляд, оказалось включение метки в участок полипептидной цепи, образованный остатками 93–112, который по данным рентгеноструктурного анализа удален от поверхности вируса и контактирует с молекулой РНК. Авторы предположили, что в местах «стыковки» трех субъединиц белка оболочки существуют каналы, через которые атомы трития проникают в глубину вириона и взаимодействуют с расположенными на их «дне» остатками 93–112 и вирусной РНК. На рентгенограмме эти области диаметром 3–5 Å характеризуются как участки с пониженной электронной плотностью.^{114–116} Похоже, что подобные каналы наблюдались и в работе Неймана с соавт.¹²⁰ при исследовании структуры фага MS2. В соответствии с их данными 25% метки включается во внутрифаговую РНК, что также свидетельствует о том, что в капсиде фага между молекулами белка остается достаточное количество «пор», через которые атомы трития взаимодействуют с внутренними областями фага.

Заслуживает внимания попытка сопоставить полученную информацию о поверхности вириона с данными о локализации антигенных детерминантов. На рис. 14 отмечены участки 1–10, 62–68 и 153–158, являющиеся антигенными детерминантами белка в составе вируса.¹¹⁶ Можно видеть, что все они попадают в число фрагментов, доступных мечению тритием. Безусловно, атомы трития — не лучший инструмент для локализации антигенных детерминантов. Малые размеры атома трития ($\sim 1 \text{ \AA}$) позволяют ему, образно говоря, слишком много «видеть». Однако знание поверхностных участков, без сомнения, облегчает эту работу, сужая круг поиска.

Результаты, полученные на модельном объекте, стимулировали работу с вирусом, о структуре которого (прежде всего о конформации субъединиц белка оболочки и их упаковке в вирионе) было известно довольно мало. Это Х вирус картофеля (ХВК) — один из наиболее распространенных представителей группы потексвирусов. Его гибкий стержнеобразный вирион содержит одноцепочечную РНК, а капсид вириона образован идентичными субъединицами белка из 236 аминокислотных остатков. Данные о поверхности вириона к моменту начала работы были весьма немногочисленны и до некоторой степени противоречивы. Иммунологические исследования свидетельствовали о локализации на поверхности вириона N-концевой области белка (см., например,¹²¹). Предсказание элементов вторичной структуры белка оболочки ХВК, с использованием в качестве первого приближения пространственной структуры ВТМ,

позволило Сауэру с соавт.¹²² предположить некую общность черт формирования архитектуры вирионов, а именно, поверхностную локализацию N- и С-концевых областей белка. Позже Шукла с соавт.¹²³ постулировали общность сворачивания полипептидной цепи белка с поверхностной локализацией их N- и С-концевых частей для всех стержнеобразных растительных вирусов.

При сравнительном изучении методом тритиевой планиграфии интактных и *in situ* деградированных (лишенных первых 19 аминокислот под действием протеазы клеточного сока¹²⁶) частиц ХВК было показано, что распределение метки (рис. 16,а) отличается от того, которое наблюдалось для ВТМ (см. рис. 14): отсутствуют резкие границы между доступными и недоступными участками. Это создает впечатление, что ХВК обладает значительно более «рыхлой» структурой, чем ВТМ.^{124, 125} Примечательно, что на первые 19 аминокислот в интактном вирусе приходится 85% от суммарной метки, включенной в препарат. Это показывает, что весь N-концевой участок белка экспонирован на поверхности вируса. Отсутствие первых 19 концевых аминокислот (рис. 16,б) в белке оболочки *in situ* деградированного вирусного препарата приводит к качественному изменению картины мечения. Видно, что атомам трития становится доступной С-концевая область белка, которая до того, по всей видимости, была «прикрыта» N-концевой частью белка оболочки.

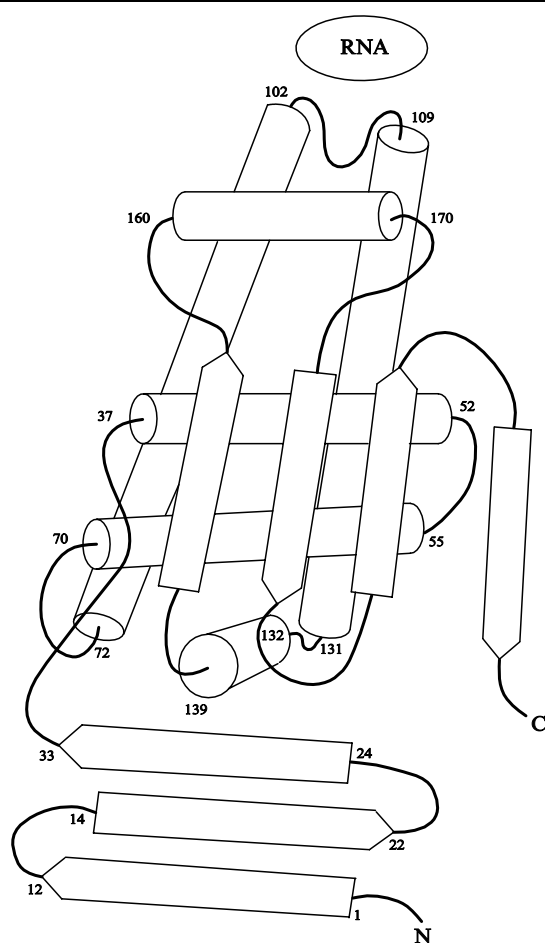


Рис. 17. Модель пространственной упаковки полипептидной цепи белка оболочки ХВК. α -Спирали показаны в виде цилиндров, β -структурные участки обозначены стрелками. Числами обозначены границы структурированных участков

На основании результатов тритиевой планиграфии, известных биохимических и иммунологических данных, а также основных принципов укладки предсказанных элементов вторичной структуры в глобулярных белках авторы работы¹²⁵ предложили модель третичной структуры белка оболочки ХВК (рис. 17). В модели одна β -складка, содержащая β -структурные области 1–12, 14–22 и 24–33, фланкирует молекулу и образует внешнюю поверхность вирусных частиц.

В заключение этого раздела кратко остановимся еще на одном круге задач, в решении которых использование метода тритиевой планиграфии может быть достаточно эффективным. В современной молекулярной иммунологии и иммунохимии существует понятие о линейных и конформационных белковых антигенных детерминантах. Полагают, что линейные детерминанты составлены из нескольких аминокислотных остатков, представляющих собой определенный участок в последовательности белка, в то время как конформационные детерминанты содержат аминокислотные остатки из различных, пространственно сближенных в нативной структуре глобулы белка частей последовательности.

Однако последние исследования позволяют считать, что все антигенные детерминанты являются конформационными.^{127, 128} Действительно, поверхность белка, определенная по данным рентгеноструктурного анализа, весьма сложна и имеет очень изрезанный рельеф. Даже визуальный анализ любой структуры показывает, что остатки на поверхности белка в большинстве своем имеют соседей, весьма удаленных по первичной структуре белка. Более того, части поверхности белка, которые наиболее «непрерывны», являются в основном петлями и/или выступающими областями. Именно это объясняет, почему такие качества поверхности, как гидрофильность, доступность, подвижность могут быть использованы для предсказания потенциально возможных антигенных детерминант. Это хорошо иллюстрирует обнаруженная на примере вирусов ВТМ и ХВК, а ранее на глобулярных белках корреляция доступности для атомов трития этих участков структуры и их антигенности. Описание структуры объекта по данным о его поверхности (из анализа тритиевого мечения), а также сравнительный анализ поверхности свободного белка и белка в комплексе с моноклональным антителом позволит, как нам кажется, решить проблему определения конформационных детерминант. Пока же это реализуется лишь на уровне возможностей рентгеноструктурного анализа таких комплексов в сочетании с сайт-направленным мутагенезом.¹²⁹

Литература

1. G.M.Clore, M.A.Roben, A.M.Gronenborn. *J. Mol. Biol.*, **231**, 82 (1993)
2. R.Henderson, J.M.Baldwin, T.M.Ceska, F.Zemlin, E.Beckmann, K.H.Downing. *J. Mol. Biol.*, **213**, 899 (1990)
3. D.N.Wang, W.J.Kuhlbrandt. *J. Mol. Biol.*, **217**, 691 (1991).
4. A.Holzenburg, F.H.Wilson, M.E.Finlow, R.C.Ford. *Biochem. Soc. Trans.*, **20**, 591 (1992)
5. H.Arakawa, K.Umemura, A.Ikai. *Nature*, **358**, 171 (1992)
6. S.Colacicchi, M.Ferrari, A.Sotgin. *Int. J. Biochem.*, **24**, 205 (1992)
7. J.A.Thompson, A.L.Lau, D.D.Cunningham. *Biochemistry*, **26**, 743 (1987)
8. B.H.Robertson, V.K.Brown, B.P.Holloway, B.Khanna, E.Chan. *Arch. Virol.*, **104**, 117 (1989)
9. P.R.Schimmel, H.J.P.Schoemaker. *Methods Enzymol.*, **59**, 332 (1979)
10. Л.А.Нейман, В.С.Смоляков, А.В.Шишков. *Общие проблемы физико-химической биологии. Т.2. (Итоги науки и техники)*. Изд-во ВИНТИ, Москва, 1985
11. M.Menzinger, R.Wolfgang. *J. Chem. Phys.*, **50**, 2991 (1969)
12. M.Menzinger, R.Wolfgang. *J. Am. Chem. Soc.*, **89**, 5992 (1967)
13. В.Н.Кондратьев. *Константы скорости газофазных реакций*. Справ., Наука, Москва, 1970

14. I.Langmuir. *J. Am. Chem. Soc.*, **34**, 1310 (1912)
15. R.Klein, M.D.Sheer. *J. Phys. Chem.*, **62**, 1011 (1958)
16. А.Н.Пономарев, В.Л.Тальрозе. *Докл. АН СССР*, **130**, 120 (1960)
17. Л.А.Нейман, В.С.Смоляков, Л.П.Антропова, И.А.Гедрович, И.А.Каширин, А.В.Шишков. В кн. *И Всесоюзный биофизический съезд. (Тез. докл.: стендовые сообщения 1690-2318)*. Москва, 1982. С.214
18. H.C.Moser, P.Nordin, J.K.Senne. *Int. J. Appl. Radiat. Isot.* **15**, 557 (1964)
19. P.Nordin, H.C.Moser, J.K.Senne. *Biochem. J.*, **96**, 336 (1965)
20. А.В.Шишков, Э.С.Филатов, Е.Ф.Симонов, М.С.Унукович, В.И.Гольдманский, А.Н.Несмеянов. *Докл. АН СССР*, **228**, 1237 (1976)
21. A.K.E.Nagopian, R.H.A.Johnsen. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, **20**, 837 (1974)
22. А.В.Волынская, А.Ю.Скрипкин, А.В.Шишков, В.И.Гольдманский. *Докл. АН СССР*, **266**, 871 (1982)
23. А.В.Гедрович, Г.А.Бадун. *Молекуляр. биология*, **26**, 558 (1992)
24. М.М.Юсупов, А.С.Спирин. *Methods Enzymol.*, **164**, 426 (1988)
25. Л.А.Баратова, В.И.Гольдманский, Ю.М.Румянцев, М.С.Унукович, А.В.Шишков. *Молекуляр. биология*, **16**, 117 (1982)
26. A.F.Trotman-Dickenson, G.S.Milne. *Natl. Stand. Res.-Natl. Bur. Stand.*, **9**, 41 (1967)
27. В.И.Гольдманский, Ю.М.Румянцев, А.В.Шишков, Л.А.Баратова, Л.П.Белянова. *Молекуляр. биология*, **16**, 528 (1982)
28. S.E.V.Philips. *Nature*, **273**, 247 (1978)
29. B.K.Lee, F.M.Richards. *J. Mol. Biol.*, **55**, 379 (1971)
30. S.A.Islam, D.L.Weaver. *Proteins: Structure, Function and Genetics*, **10**, 300 (1991)
31. E.Stellwagen, M.Wilgus. *Nature*, **275**, 342 (1978)
32. S.H.Bryant, S.A.Islam, D.L.Weaver. *Proteins: Structure, Function and Genetics*, **6**, 418 (1989)
33. R.E.Gates. *J. Mol. Biol.*, **127**, 345 (1979)
34. S.Miller, J.Janin, A.M.Lesk, C.Chothia. *J. Mol. Biol.*, **196**, 641 (1987)
35. J.Janin, S.Miller, C.Chothia. *J. Mol. Biol.*, **204**, 155 (1988)
36. C.Chothia. *Nature*, **254**, 304 (1975)
37. D.J.Barlow, J.M.Thornton. *Mol. Graphics*, **4**, 97 (1986)
38. D.J.Barlow, J.M.Thornton. *Biopolymers*, **25**, 1717 (1986)
39. D.W.Fanning, J.A.Smith, G.D.Rose. *Biopolymers*, **25**, 863 (1986)
40. D.M.Novotny, M.Handschumacher, E.Haber, R.E.Brucolletti, W.B.Carlson, D.W.Fanning, J.A.Smith, G.D.Rose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 226 (1986)
41. Yu.Chirgadze, N.Kurochkina, S.Nikonov. *Protein Eng.*, **3**, 105 (1989)
42. G.Neweths, H.A.Scheraga. *Q. Rev. Biophys.*, **10**, 239 (1977)
43. M.Levit, C.Chothia. *Nature*, **261**, 552 (1976)
44. C.Chothia. *Ann. Rev. Biochem.*, **53**, 537 (1984)
45. А.В.Волынская, А.Ю.Скрипкин, А.В.Шишков, Э.С.Джафаров, Ю.М.Румянцев, В.И.Гольдманский. *Молекуляр. биология*, **19**, 1294 (1985)
46. А.Б.Ивлев, А.В.Гедрович, А.В.Шишков. *Молекуляр. биология*, **26**, 1047 (1992)
47. Е.Н.Богачева, А.А.Шишков, А.В.Шишков, Л.А.Баратова. *Молекуляр. биология*, 1994 (в печати)
48. D.C.Carter, He Hiao-min, S.H.Munson, F.D.Twigg, K.M.Gernett, M.B.Broom, T.Y.Miller. *Science*, **244**, 1195 (1989)
49. А.В.Волынская, Е.А.Касумов, Е.Н.Богачева, А.В.Шишков, В.И.Гольдманский. *Eur. J. Biophys.*, 1994 (in press)
50. T.Peters. *Adv. Clin.Chem.*, **13**, 37 (1970)
51. E.Keshavarz, S.Nakai. *Biophim. Biophys. Acta*, **576**, 269 (1979)
52. А.В.Волынская, В.Н.Измайлова, В.А.Пчелин. *Биофизика*, **18**, 210 (1973)
53. К.Е.Бобкова, А.В.Гедрович, В.Н.Анкилова, О.И.Лаврик, Л.А.Баратова, А.В.Шишков. *Биохимия*, **55**, 1570 (1990)
54. Е.В.Бобкова, А.В.Гедрович, В.Н.Анкилова, О.И.Лаврик, Л.А.Баратова, А.В.Шишков. *Biochem. Int.*, **20**, 1001 (1990)
55. А.В.Гедрович, Л.А.Баратова, Е.Н.Богачева, В.Н.Медведкин, А.В.Шишков. *Молекуляр. биология*, **27**, 309 (1993)
56. А.В.Волынская, С.А.Мурашова, А.Ю.Скрипкин, А.В.Шишков, В.И.Гольдманский. *Молекуляр. биология*, **23**, 356 (1989)
57. А.Ю.Скрипкин, А.В.Волынская, А.В.Шишков, В.И.Гольдманский. *Молекуляр. биология*, **23**, 365 (1989)
58. K.Hamaguchi, K.Rokkaku. *J. Biochem.*, **48**, 358 (1960)
59. H.Edelhoc, R.F.Steiner. *Biochim. Biophys. Acta.*, **60**, 359 (1962)
60. Е.А.Касумов, А.В.Волынская, А.В.Шишков, В.И.Гольдманский. *Stud. biophys.*, **136**, 167 (1990)
61. Ch.N.Cornell, L.J.Kaplan. *Biochemistry.*, **17**, 1750; 1755 (1978)
62. J.Welting, M.M.Weideman, A.C.-J.Roomer, J.H.Perrin. *Biochim. Biophys. Acta*, **579**, 469 (1979)
63. Э.С.Джафаров. *Молекуляр. биология*, **25**, 1412 (1991)
64. Э.С.Джафаров, Л.А.Алиев, А.Ю.Скрипкин, А.В.Волынская, А.В.Шишков, Л.А.Баратова, В.И.Гольдманский. *Изв. АН АзССР*, (3), 102 (1985)
65. S.F.Sun. *Arch. Biochem. Biophys.*, **129**, 411 (1969)
66. V.Luzzati, J.Witz, A.Nicholaieff. *J. Mol. Biol.*, **3**, 379 (1961)
67. М.Жоли. В кн. *Физическая химия денатурации белков*. Мир, Москва, 1968. С.38
68. В.А.Кашпур, В.Я.Малеев, Т.Ю.Щеголева. *Молекуляр. биология*, **10**, 568 (1976)
69. J.White, M.Kielian, A.Helenius. *Q. Rev. Biophys.*, **16**, 151 (1983)
70. D.Hoekstra, J.W.Kok. *Biosci. Rep.*, **9**, 273 (1989)
71. S.E.Glushakova, A.L.Ksenofontov, N.V.Fedorova, L.A.Mazhul, O.N.Ageeva, L.B.Margolis, L.A.Baratova, A.V.Shishkov. *Biosci. Rep.*, **11**, 131 (1991)
72. A.L.Ksenofontov, A.L.Danilov, S.E.Glushakova, L.B.Margolis, L.A.Baratova, A.V.Shishkov. *Biochem. Int.*, 1994 (in press)
73. M.Karplus, J.A.McCammon. *CRC Crit. Rev. Biochem.*, **9**, 293 (1981)
74. M.Levit. *J. Mol. Biol.*, **168**, 595 (1983)
75. M.Levit. *J. Mol. Biol.*, **168**, 621 (1983)
76. Е.Н.Фролов, О.В.Белоногова, Г.И.Лихтейнштейн. В кн. *Равновесная динамика нативной структуры белка*. НЦБИ, Пушкино, 1977. С.99
77. V.I.Goldanskii, Yu.F.Krupyanskii. *Hyperfine Interact.*, **39**, 341 (1988)
78. Е.Н.Богачева, Н.Д.Жуков, А.В.Шишков. *Молекуляр. биология*, **27**, 1044 (1993)
79. А.В.Шишков, Л.А.Нейман, В.С.Смоляков. *Успехи химии*, **53**, 1125 (1984)
80. I.V.Kurinov, Yu.F.Krupyanskii, I.P.Suzdalev, V.I.Goldanskii. *Hyperfine Interact.*, **33**, 223 (1987)
81. C.Chothia. *J. Mol. Biol.*, **105**, 1 (1976)
82. M.E.Snow. *Proteins; Structure, Function and Genetics*, **15**, 183 (1993)
83. F.E.Cohen, S.R.Presnell, L.M.Gregoret, I.D.Kuntz. In *Protein folding: Deciphering the second half of the Genetic Code*. (Eds L.Gierasch, J.King). DC/AAAS, Washington, 1990. P.251
84. R.Unger, J.Moult. *J. Mol. Biol.*, **231**, 75 (1993)
85. S.Saitoh, T.Nakai, K.Nishikawa. *Proteins: Structure, Function and Genetics*, **15**, 191 (1993)
86. А.В.Шишков, Ю.М.Румянцев, М.С.Унукович, В.И.Гольдманский, Е.Ф.Симонов, Э.С.Филатов, Л.А.Баратова, Л.П.Белянова, Р.К.Леднева. В кн. *IV Всесоюз. симпозиум по химии белков и пептидов. (Тез. докл.)*. Минск, 1977. С.23
87. G.J.Stubbs, S.G.Warren, K.S.Holmes. *Nature*, **267**, 216 (1976)
88. А.В.Гедрович, А.В.Шишков, В.И.Гольдманский, Л.А.Баратова, Н.И.Гребеншчиков, А.В.Ефимов. *Eur. Biophys.*, **19**, 283 (1991)
89. P.V.Chow, G.D.Fasman. *Annu Rev. Biochem.*, **47**, 251 (1978)
90. V.I.Lim. *J. Mol. Biol.*, **88**, 872 (1974)
91. O.B.Ptzyzn, A.A.Rashin. *Biophys. Chem.*, **3**, 1 (1975)
92. R.H.Tufty, R.H.Kretsinger. *Science*, **187**, 167 (1975)
93. P.C.Moews, R.H.Kretsinger. *J. Mol. Biol.*, **91**, 210 (1975)
94. А.В.Гедрович, М.М.Юсупов, А.В.Шишков, В.И.Гольдманский, А.С.Спирин. *Докл. АН СССР*, **267**, 1255 (1982)
95. М.М.Юсупов, А.С.Спирин. *Биохимия*, **51**, 1858 (1986)
96. М.М.Юсупов, А.С.Спирин. *FEBS Lett.*, **197**, 229 (1986)
97. И.А.Каширин, А.В.Гедрович, А.В.Шишков, В.К.Каграманова, Л.А.Баратова. *Биоорг. химия*, **9**, 1531 (1983)
98. В.А.Колб, А.А.Коммер, А.С.Спирин. *Докл. АН СССР*, **296**, 1497 (1987)
99. V.A.Kolb, A.A.Kommer, A.S.Spirin. *Mechanism and Control of Translation*. Noordwijkerhout, Netherlands, 1990
100. N.D.Belyaev, V.G.Budker, V.A.Dubrovskaya, A.A.Kim, E.V.Kiseleva, V.N.Sidorov. *FEBS Lett.*, **297**, 43 (1992)

101. И.А.Филатов, М.А.Кулиш, А.Ф.Миронов, Е.В.Ножевникова, Л.А.Нейман. *Биоорг. химия*, **13**, 623 (1987)
102. Н.Г.Котлова, М.А.Кулиш, А.Ф.Миронов. *Биоорг. химия*, **14**, 1695 (1988)
103. В.Kadenbach, A.Stroh. *FEBS Lett.*, **173**, 374 (1984)
104. Л.В.Гордеева, Л.А.Баратова, Л.Б.Марголис, А.В.Шишков. *Биофизика*, **34**, 971 (1989)
105. А.Б.Курятов, В.В.Шемякин, Л.П.Антропова. В кн. *16 конф. ФЕБО. (Тез.докл.)*. Москва, 1984. С.335
106. А.Б.Курятов, А.С.Арсеньев, Т.Н.Аленичева, Л.А.Нейман, В.И.Цетлин. В кн. *Международ. симп. «Ретинальсодержащие белки»*. (Тез. докл.). Москва, 1986. С.76
107. Yu.A.Ovchinnikov, N.G.Abdulaev, R.G.Vasilov, I.Yu.Vturina, A.V.Kuryatov, A.V.Kiselev. *FEBS Lett.*, **179**, 343 (1985)
108. J.K.Mohana Rao, P.Argos. *Biochim. Biophys. Acta.*, **869**, 197 (1986)
109. Yu.A.Ovchinnikov, N.G.Abdulaev, M.Yu.Feigina, A.V.Kiselev, N.A.Lobanov. *FEBS Lett.*, **100**, 219 (1979)
110. D.M.Engelman, R.Henderson, A.D.Mclachlan, B.A.Wollace. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 2023 (1980)
111. Т.Н.Аленичева, А.Б.Курятов, Л.П.Антропова, В.В.Шемякин, Л.А.Нейман, В.И.Цетлин, В.Т.Иванов. *Биоорг. химия*, **13**, 898 (1987)
112. R.Henderson. *J. Mol. Biol.*, **93**, 123 (1975)
113. Д.Н.Островский, В.А.Еремин, И.Г.Жукова, А.А.Масягин, А.В.Шишков. *Микробиология*, **57**, 875 (1988)
114. K.Namba, G.Stubbs. *Science*, **231**, 1401 (1986)
115. G.Stubbs, S.Warren, K.Holmes. *Nature*, **267**, 216 (1977)
116. D.Altshuh, D.Hartman, J.Reinbolt, M.H.V.Van Regenmortel. *Mol. Immunol.*, **20**, 271 (1983)
117. И.А.Каширин, Н.И.Гребенщиков, Л.А.Баратова, А.В.Шишков, В.И.Гольдандский. *Молекуляр. биология*, **20**, 1264 (1986)
118. И.В.Каширин, Н.И.Гребенщиков, Л.А.Баратова, А.В.Шишков, В.И.Гольдандский. *Молекуляр. биология*, **21**, 456 (1986)
119. V.I.Goldanskii, I.A.Kashirin, A.V.Shishkov, L.A.Baratova, N.I.Grebenschikov. *J. Mol. Biol.*, **201**, 567 (1988)
120. Л.А.Нейман, Л.П.Антропова, М.А.Залеская, Э.И.Будовский. *Биоорг. химия*, **12**, 1070 (1986)
121. J.Sober, L.V.Jarvekulg, I.E.Toots, Yu.L.Radavsky, R.Villems, M.Saarma. *J. Gen. Virol.*, **69**, 1799 (1988)
122. L.Sawyer, P.Tollin, H.R.Wilson. *J. Gen. Virol.*, **68**, 1229 (1987)
123. D.D.Shukla, P.M.Strike, S.L.Tracy, K.H.Gough, C.M.Ward. *J. Gen. Virol.*, **69**, 1497 (1988)
124. L.A.Baratova, N.I.Grebenschikov, A.V.Shishkov, I.A.Kashirin, Yu.L.Radavsky, L.Jarvekulg, M.Saarma. *J. Gen. Virol.*, **73**, 229 (1992)
125. L.A.Baratova, N.I.Grebenschikov, E.N.Dobrov, A.V.Gedrovich, I.A.Kashirin, A.V.Shishkov, A.V.Efimov, L.Jarvekulg, Yu.L.Radavsky, M.Saarma. *Virology*, **188**, 175 (1992)
126. М.И.Гольштейн, Н.И.Гребенщиков, С.В.Куст, А.С.Кафтанова, Е.Н.Добров, И.Г.Атабеков. *Молекуляр. генетика, микробиология и вирусология*, (2), 9 (1990)
127. M.H.V.Regenmortel. *Hybridoma Technology in Agriculture Veterinary Research. Ch.3* (Eds N.J.Stern, H.R.Gramble). Rowman and Allanheld, New Jersey, 1984
128. D.J.Barlow, M.S.Erwards, J.M.Thornton. *Nature*, **322**, 747 (1986)
129. J.M.Nuss, P.B.Whitaker, G.M.Air. *Proteins: Structure, Function and Genetics*, **15**, 121 (1993)

TRITIUM PLANIGRAPHY OF BIOLOGICAL SYSTEMS

A.V.Shishkov, L.A.Baratova

N.N.Semenov Institute of Chemical Physics, Russian Academy of Sciences

4, Ul. Kosygina, 117977 Moscow, Russian Federation, Fax +7(095)938-2150

A.N.Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, M.V.Lomonosov Moscow State University

Vorob'evy Gory, 119899 Moscow, Russian Federation, Fax +7(095)939-3181

The transfer of the ideas and methods of nuclear physics and nuclear chemistry into the structural biology has led to the creation of new experimental method for studying the topography of the accessible surface and three-dimensional structure of biological objects. Some papers, which lay in base of the tritium planigraphy method are considered, as well as the principal trends of their evolution in application to tasks of molecular biology.

Bibliography — 129 references.

Received 8 June 1994