

Современные достижения рентгеноструктурного анализа белков

Е.М.Попов

Институт биоорганической химии им. М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова

Российской академии наук

117871 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10, факс (095)310–7007

Проанализировано современное состояние и перспективы развития рентгеновской кристаллографии глобулярных белков. На основе ставших известными в последние годы трехмерных структур белковых молекул рассмотрены механизмы функционирования мембранных рецепторов, иммунных белков Т-лимфоцитов, гистонового октамерного коры нуклеосом, ДНК-топоизомеразы, аспартатных протеаз ретровирусов и белков актомиозинового комплекса скелетных мышц. Показано, что решающую роль в создании экспериментальной основы и разработке необходимых для становления теоретической биологии подходов сыграли результаты рентгеноструктурного анализа белков. Значительная часть обзора посвящена достижениям рентгеновской кристаллографии, касающимся источников излучения, фазовой проблемы и условий проведения эксперимента. Использование синхротронной радиации и отказ от мультиплетного изоморфного замещения при установлении фаз не только существенно упрощают изучение молекулярной структуры белков, но и позволяют приблизиться к получению ранее недоступной информации о строении белковых интермедиатов.

Библиография — 324 ссылки.

Оглавление

I. Введение	1143
II. Мембранные белки	1144
III. Белки иммунной системы	1147
IV. Аспартатные протеазы	1151
V. ДНК-Связывающие белки	1161
VI. Белки скелетных мышц	1165
VII. Синхротронное излучение	1169
VIII. Многоволновая аномальная дифракция	1175
IX. Заключение	1177

I. Введение

В конце 1950-х начале 1960-х годов было завершено одно из самых выдающихся научных исследований не только в биологии, но и во всем естествознании уходящего столетия. Перутц и Кендрю расшифровали трехмерные структуры гемоглобина и миоглобина, впервые решив поставленную еще более четверти века до этого Берналом задачу определения с помощью рентгеновской дифракции пространственного строения белковых молекул. Это событие означало становление нового направления в развитии биологии — морфологии элементарных биосистем, открывающей невиданные ранее возможности в познании строения живой материи. Без знания атомно-молекулярной структуры белков нельзя понять природу и специфику их взаимодействий, механизмы функционирования ферментов, иммунной системы, генетического аппарата, мембранных белков и многого

другого. Достижения первых работ имели универсальное значение, что и отразилось на состоянии практически всех направлений исследований органического мира. По прошествии более трех десятилетий со времени публикаций Перутца и Кендрю рентгеноструктурный анализ все еще остается единственным прямым методом определения на атомном уровне пространственного строения белковых молекул и их комплексов. Полученные с его помощью данные по-прежнему служат незаменимой экспериментальной основой любых поисков решений таких фундаментальных проблем, какими являются проблемы структурной и структурно-функциональной организации белковых молекул. Учитывая активную роль белков в процессах жизнедеятельности, их универсальные биохимические и биофизические свойства, можно утверждать, что создание теорий структурной и структурно-функциональной организации белков, будет означать становление количественной теоретической биологии.

После классических работ Перутца и Кендрю, а также Филиппса, установившего в 1965 г. трехмерную структуру первого фермента — лизоцима, рентгеноструктурный анализ стал развиваться быстрыми темпами во многих научных центрах. Спустя лишь два года были расшифрованы структуры рибонуклеазы А,^{1,2} α -химотрипсина³ и карбокси-peп-тидазы А.⁴ К 1975 г. число белков, кристаллические структуры которых стали известны с разрешением менее 3.5 Å, достигло 70 (см.⁵), в настоящее время оно приближается к 3000 (см.⁶).

Е.М.Попов. Доктор химических наук, профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории химии ферментов ИБХ РАН.
Область научных интересов: биофизика и молекулярная спектроскопия.

Дата поступления 23 июня 1995 г.

Темп здесь определяется главным образом трудностями получения монокристаллических образцов достаточного размера и высокой степени упорядоченности. Белки не образуют регулярные макроскопические структуры в клетках и организмах, и выращивание белковых кристаллов в лабораторных условиях требует большого искусства и терпения. О трудностях получения качественных образцов говорится почти во всех работах. Типично, например, замечание авторов работы⁷, исследовавших трехмерную структуру липсиксигеназы-1, фермента из 839 аминокислотных остатков: «Кристаллы белка удалось получить после опробования более тысячи различных условий кристаллизации».

Данный обзор посвящен анализу современного состояния рентгеновской кристаллографии белков и перспективам развития метода в ближайшем будущем. С этой целью из множества публикаций выбраны те исследования, которые в чем-то (например, по сложности объекта, его новизне, особой познавательной ценности, точности определения координат атомов или каких-либо методологических достоинств) являются на сегодняшний день наивысшими достижениями.

В гл. II–VI изложены результаты рентгеноструктурных исследований белков, научная значимость которых обусловлена важностью самих объектов анализа. В ней обсуждены ставшие известными лишь в последние годы пространственные структуры молекул мембранных рецепторов, иммунных белков Т-лимфоцитов, гистонового октамерного корануклеосома, ДНК-топоизомеразы, аспартатных протеаз ретровирусов и белков актомиозинового комплекса скелетных мышц. Работы такого плана определяют экстенсивное развитие морфологии биосистем атомно-молекулярного уровня и будут продолжаться с возрастающей интенсивностью.

В гл. VII и VIII акцент сделан на использованные впервые методические усовершенствования рентгеноструктурного анализа белков, касающиеся источников излучения, времени экспозиции, фазовой проблемы и условий проведения эксперимента. Новшества такого рода представляют особый интерес, поскольку именно они приводят к получению ранее недоступной информации и, следовательно, ведут к интенсивному развитию морфологии белков.

II. Мембранные белки

Одно из самых значительных достижений рентгеноструктурного анализа белков последних лет состоит в начавшейся расшифровке трехмерных структур первых мембранных белков. Целесообразно кратко сообщить о том, что было известно об этих белках до исследования их с помощью рентгеновской дифракции. В обычной плазматической мембране белок составляет около 50% ее массы. Однако в некоторых мембранах, например, во внутренних мембранах митохондрий и хлоропластов, его содержание увеличивается до 75%, а в других, например, миелиновой мембране, снижается до 25%. Многие мембранные белки пронизывают липидный бислой насквозь и контактируют с водной средой по обеим сторонам мембраны. Молекулы этих белков, называемых трансмембранными, как и окружающие их молекулы липидов, обладают амфипатическими свойствами, поскольку содержат гидрофобные участки, взаимодействующие внутри бислоя, с гидрофобными хвостами липидов, и гидрофильные участки, обращенные к воде с обеих сторон мембраны. Другая группа мембранных белков соприкасается с водой только с одной стороны бислоя. Одни из них погружены во внешний или во внутренний слой мембраны, другие ассоциированы за счет невалентных взаимодействий с трансмембранными белками, третьи прикреплены к мембране с помощью ковалентно связанных с ними цепей жирных кислот, внедренных в липидный слой.

Благодаря динамическим свойствам мембран ассоциированные с ними белки поддаются отделению от липидов. Иногда эта операция довольно проста и совершается в

мягких условиях, например, путем экстракции солевым раствором. Освобождаемые мембранные белки называются периферическими. В других случаях, касающихся обычно трансмембранных белков, выделение более сложно и не всегда заканчивается удачно. Многие белки, получившие по способу их очистки название «интегральных», удается выделить только после полного разрушения бислоя с помощью детергентов и органических растворителей. При смешивании с мембраной неполярные, гидрофобные концы молекул детергента взаимодействуют с липидами и, разрушая их ассоциацию с белками, связываются с гидрофобными участками последних. Благодаря этому полярные, гидрофильные концы белков оказываются ориентированными в водную среду. Солюбилизованные мембранные белки, приобретающие способность растворяться в воде, переходят в раствор в виде комплексов с детергентом. При удалении последнего белки эту способность теряют и выпадают в осадок, образуя смесь различных белков. Как правило, мембраны предварительно прогревают до 100°C в 1%-ном растворе сильного детергента, что приводит к разрушению всех нековалентных белок-белковых и белок-липидных взаимодействий. Гелениус и Симонс⁸ разработали метод разделения белков электрофорезом в полиакриламидном геле в присутствии детергента (додецилсульфата натрия).

Дальнейшая работа с мембранными белками — изучение их функций, механизмов действия и пространственных структур — натолкнулась на большие трудности. Оказалось, что высвобождение белковых молекул из мембраны часто сопровождается необратимой денатурацией их нативных структур и, следовательно, потерей активности. В редких благоприятных случаях при солюбилизации белков в мягких условиях и при их низких концентрациях функциональные свойства не пропадают, что указывает на сохранение, по крайней мере частично, нативных конформаций. Наиболее детальная информация о белках и липидном бислое получена при изучении плазматической мембраны эритроцитов человека, содержащих гемоглобин — немембранный белок, представленный в этой клетке в наибольшем количестве. Удобство данного объекта обусловлено тем, что мембраны эритроцитов, называемые «теньями», являются единственными в клетке и их легко выделить в чистом виде с разрывом и без разрыва и даже получить вывернутыми наизнанку. При изучении теней эритроцитов впервые удалось установить, что некоторые мембранные белки пронизывают насквозь мембранный бислой, а внешняя и внутренняя стороны мембраны являются асимметричными. Исследования белков плазматической мембраны эритроцитов человека методом одномерного электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия привело к идентификации около 15 главных белков с молекулярными массами от 15 до 250 кДа. Три из них — спектрин, гликофорин и, так называемый белок полосы III — составляют в сумме более 60% от массы всех мембранных белков клетки. Они поразному связаны с мембраной и могут служить примерами трех типичных способов ассоциации белков с мембранами.

Спектрин (240 кДа) в равной мере можно считать и мембранным белком, и компонентом цитоскелета эритроцитов. Две его полипептидные цепи, закрученные друг относительно друга, образуют подвижные димеры, которые посредством взаимодействий с короткими актиновыми филаментами и другими белками объединены в тетрамеры, покрывающие плотной сетью цитоплазматическую поверхность мембраны. Структурная организация позволяет спектрину регулировать подвижность белков и их распределение в плазматической мембране.

Гликофорин — первый мембранный белок, для которого была определена аминокислотная последовательность. Этот трансмембранный гликопротеин содержит 131 аминокислотный остаток и около 100 остатков сахара; его молекулярная масса равна 30 кДа. Из рис. 1 видно, что большая часть

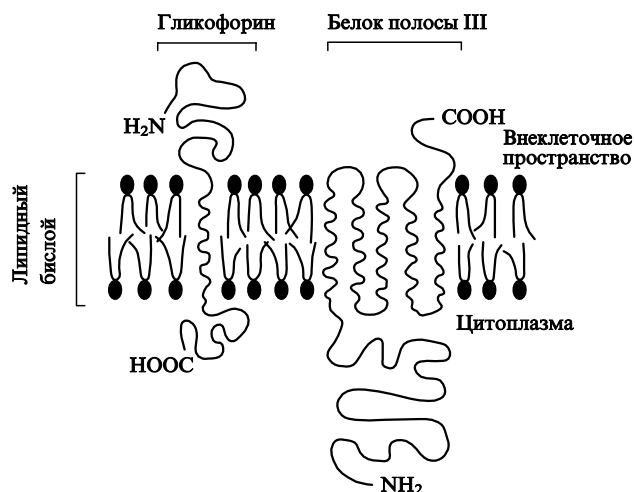


Рис. 1. Схема расположения гликофорина и белка полосы III в мембране эритроцитов человека

полипептидной цепи гликофорина находится на наружной поверхности мембраны, где локализован гидрофильный N-концевой фрагмент. С-Концевой участок цепи, также составленный преимущественно из гидрофильных остатков, погружен в цитоплазму, а гидрофобный фрагмент в форме единичной α -спирали из 20 аминокислотных остатков пронизывает неполярный липидный бислой.

Белок полосы III из мембраны эритроцитов человека представляет собой трансмембранный белок с молекулярной массой около 100 кДа (примерно 800 аминокислотных остатков). Это транспортный белок, две молекулы которого образуют анионный канал для ионов Cl^- и HCO_3^- , протекающих пассивно через мембрану в соответствии с градиентами их концентраций. Полипептидная цепь белка в α -спиральной конформации несколько раз пронизывает бислой; около трети цепи с N-конца помещена в цитоплазму, а короткий С-концевой участок расположен во внеклеточном пространстве (см. рис. 1). Чтобы понять механизм функционирования транспортного белка полосы III, как и механизмы действия других мембранных белков, нужно, как минимум, знать трехмерную структуру молекулы в условиях липидного бислоя. При этом необходимо, во-первых, отделить трансмембранный белок от липидов и других мембранных белков, не повредив при этом его молекулярной трехмерной структуры, что очень трудно; во-вторых, из выделенных белковых молекул надо получить высокоупорядоченный монокристалл требуемых размеров. В 1980-е годы возник альтернативный подход к получению белковых объектов для рентгеноструктурного анализа, который затронул и кристаллографические исследования мембранных белков. Речь идет о генной инженерии, в основе которой лежит сайт-специфическая рекомбинация ДНК. В результате стало возможным создавать целенаправленные, в том числе и искусственные, генетические программы и получать требуемые белки и их фрагменты в количествах, достаточных не только для научных, но и прикладных целей. Методы генной инженерии, однако, радикально не облегчили получение кристаллических образцов, построенных из нативных конформаций белковых молекул и дающих четкие дифракционные картины. Тем не менее появившаяся перспектива получения химически чистых мембранных белков, их мутантов и составных частей любой длины и с любой вариацией аминокислотных последовательностей, значительно расширила область поиска решений этой задачи.

До недавнего времени единственным мембранным транспортным белком, для которого были известны некоторые

детали его трехмерной структуры, полученные с разрешением $\sim 7.0 \text{ \AA}$, был бактериородопсин, обнаруженный в плазматической мембране пурпурной бактерии *Halo-bacterium halobium*. Его полипептидная цепь состоит из 248 остатков. Бактериородопсин работает как фотоактивируемый протонный насос. При активации одним квантом света возбужденный хромофор вызывает конформационные изменения в белке, в результате чего два протона переносятся с внутренней поверхности клетки на наружную. В мембране создается градиент концентрации протонов и градиент электрического потенциала, которые обуславливают синтез АТФ. Молекулы бактериородопсина в мембране образуют плоскую кристаллическую решетку, подобную двумерному кристаллу. Хендерсон и Анвин⁹ использовали для определения трехмерной структуры белка и его ориентации в мембране сочетание методов электронной микроскопии низкой интенсивности и малоуглового рентгеновского рассеяния. В результате достижения в этой работе рекордной для обоих методов точности было показано, что полипептидная цепь бактериородопсина образует в мембране семь α -спиралей, каждая из которых содержит около 30 аминокислотных остатков (рис. 2). Все спирали пересекают липидный бислой примерно под прямым углом к плоскости мембраны. Они плотно упакованы и не образуют заполненного водой канала. Поэтому протоны, по-видимому, проходят через мембрану по цепочке взаимодействующих друг с другом белковых цепей α -спиральных остатков, действие которых инициируется возбужденным хромофором.

Значительная часть мембранных белков является рецепторами, т.е. аллостерическими белками, обладающими способностью при взаимодействии с гормонами — специфическими сигнальными медиаторами — определенным образом перестраивать пространственную структуру молекулы. Аллостерическое изменение конформации передается по трансмембранной цепи сопряженных белков или доменов одного большого белка внутрь клетки и стимулирует в ней соответствующий физиологический процесс. Имеющаяся информация о трехмерных структурах рецепторов и других составляющих трансмембранных белков крайне скудна. До недавнего времени удалось получить кристаллы и определить структуру только двух специфических мембранных рецепторов, фоторецепторного центра^{10,11} и порина.¹² В 90-е годы исследования рецепторных белков начинают приобретать более систематический характер. Полученные к настоящему времени сведения об их пространственном строении, как показано ниже, относятся не к структурам целых мембранных рецепторов, а пока лишь к внешним частям молекул, внеклеточным доменам.

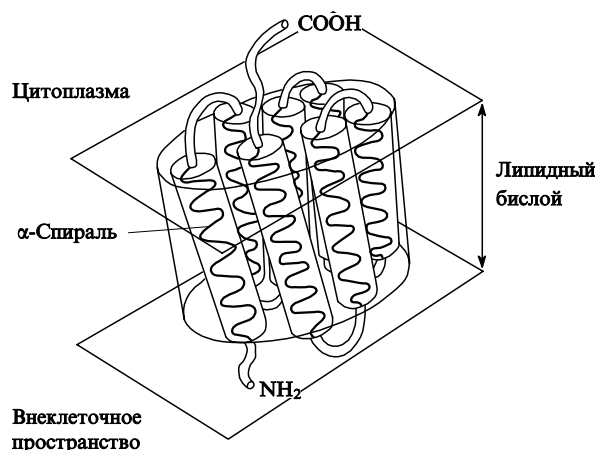


Рис. 2. Структура молекулы бактериородопсина в липидном бислое

лиганд-рецепторном комплексе образуют с аспартатом сложную сеть водородных связей. Сорбция двух молекул аспартата вызывает сближение остатков, формирующих гидрофильные карманы, и общее уплотнение димерного комплекса. Среднеквадратичное отклонение атомов S^{α} одной субъединицы (без учета фрагмента 77–85) составляет 0.47 Å, а атомов S^{α} второй субъединицы (без учета фрагмента 25–36) — 0.34 Å. Отклонения атомов S^{α} на участках 77–85 и 25–36 заметно превышают указанные величины. Конформационные изменения димера при аспартатном связывании приводят к вращению субъединицы на 4° относительно короткой оси, перпендикулярной оси второго порядка и контактирующим поверхностям лигандсвязывающих доменов. В какой мере отмеченные конформационные отклонения отражают целенаправленный аллостерический эффект рецептора, осталось пока невыясненным.

3. Структура простагландин- H_2 -синтазы (PGHS)

Важным семейством локальных химических медиаторов, источником которых являются клетки многих типов, служат простагландины — производные жирных кислот с 20 атомами углерода в цепи. Они связываются с большим числом рецепторов клеточной поверхности и вызывают сокращение гладких мышц, снижают способность тромбоцитов к агрегации, активизируют центральную нервную систему, действуют на воспалительные процессы и высвобождают ренин.¹⁸ Недавно было установлено, что простагландины играют также важную роль в патофизиологии рака и сердечно-сосудистых заболеваниях.^{19–21}

Кристаллическая структура молекулы первого мембранного фермента, простагландин- H_2 -синтазы (PGHS), была впервые установлена в 1994 г.²² Белок катализирует два процесса на первой стадии биосинтеза простагландинов. Он инициирует и активирует, во-первых, циклооксигеназную реакцию, по ходу которой арахидоновая кислота превращается в простагландин PGG_2 , и, во-вторых, последующую пероксидазную реакцию, при которой PGG_2 переходит в PGH_2 , быстро трансформирующийся в один из простаноидов. Интегральный мембранный белок PGHS локализован преимущественно в эндоплазматическом ретикулуме. Его освобождение от мембраны проводится экстракцией солевым раствором и солюбилизацией неионным детергентом, в присутствии которого осуществляется также кристаллизация. В полученном образце белковые молекулы ассоциированы с флурбипрофеном, нестероидным противовоспалительным препаратом, и образуют димерные комплексы с осью симметрии второго порядка. В клетках обнаружены два изомера простагландин- H_2 -синтазы: PGHS-1 и PGHS-2, которые отличаются своей активностью и тканевым распределением. В работе²² с разрешением 3.5 Å определена трехмерная структура PGHS-1 овцы, гликозилированного белка с молекулярной массой 70 кДа и 587-ю аминокислотными остатками, участвующего в поддержании тканевого гомеостаза. Что касается функции PGHS-2, то предполагается, что фермент ответствен за биосинтез простагландинов при делении клеток и при воспалительных процессах.

Пространственная структура молекулы PGHS-1 состоит из трех в значительной мере автономных и, по-видимому, независимо свертывающихся субъединиц: малого N-концевого домена, мембранно-связанного участка цепи и ферментного домена. Первый N-концевой домен образован участком полипептидной цепи 33–72 (остатки 1–24 являются отщепляемой сигнальной последовательностью и не входят в зрелый фермент; остатки 25–32 не могли быть интерпретированы по полученным картам электронной плотности). Его конформация, стабилизированная тремя внутримодульными дисульфидными связями, очень близка структуре эпидермального фактора роста (EGF). Полипептидные модули, подобные EGF, найдены во многих внеклеточных белках —

факторах, стимулирующих рост нейронов, свертывание крови, а также в белках поверхностных клеток, необходимых для их выживания и пролиферации. Функция EGF-подобного домена молекулы PGHS-1 неизвестна. Второй домен, включающий остатки 73–116, состоит из четырех α -спиралей, ориентированных вдоль одной стороны мономера. Его конформация, высокая амфипатичность и профиль гидрофобной поверхности с достаточной определенностью свидетельствуют о возможной интеграции фермента только в один липидный слой, и поэтому данный мембранный белок, согласно классификации Блобеля, является монотопным.²³ Третий, самый большой каталитический домен молекулы PGHS-1 (остатки 117–587), обладает глобулярной структурой, состоящей из двух закрученных друг относительно друга и тем не менее четко различаемых лепестков. Один из них, наиболее крупный, имеет V-образную форму, построенную из двух α -спиралей, скрепленных, подобно лапкам пинцета, промежуточной третьей спиралью. Эта конструкция служит каркасом, вокруг которого упакованы еще четыре α -спирали и соединяющие их петли. Малый лепесток каталитического домена представляет собой пакет из шести параллельных спиралей.

Белок PGHS-1, как бифункциональный фермент, располагает двумя активными центрами: пероксидазным и циклооксигеназным. Первый находится на поверхности узкой щели между большим и малым лепестками каталитического домена и содержит протетическую группу — высокоспиновый Fe(III)-протопорфирин IX, проксимальная поверхность которого обращена к малому лепестку. Пероксидазная активность сводится к восстановлению синтезированного в циклооксигеназном центре PGG_2 и активации циклооксигеназной реакции. Такой механизм типичен для гемзависимых пероксидаз, восстанавливающих гидропероксидазные субстраты путем реакции двухэлектронного переноса, приводящего к образованию оксоферрилпорфин-катионрадикала. Окисленный гем возвращается в первоначальное состояние после двух последовательных одноэлектронных переходов к восстанавливающимся субстратам или благодаря переходу кислорода к арилсульфидным соединениям. Молекулы PGHS-1 преимущественно восстанавливают PGG_2 и другие длинноцепочечные жирные кислоты, а также алифатические гидропероксидазы. Циклооксигеназный активный центр представляет собой длинный узкий канал (8×25 Å), идущий от внешней поверхности домена связанного с мембраной через его спирали к центру мономерной молекулы PGHS-1. Нечеткая дифракционная картина от кристаллов, выращенных пока что только для единственного фермент-ингибиторного комплекса, не позволила авторам работы²² предположить на основе полученных данных механизм каталитической реакции, протекающей в циклооксигеназном центре.

Завершая краткое рассмотрение результатов рентгеноструктурного анализа простагландин- H_2 -синтазы, следует отметить, что значение этой работы, как первого исследования трехмерной структуры мембранного фермента, заключается не только в самих экспериментальных фактах, ценность которых достаточно очевидна. Не меньшее значение работы связано с влиянием полученных данных на собственно постановку вопросов на качественно ином, более высоком уровне. Поиски решений таких важных вопросов как встраивание ферментов в мембраны, функции EGF-подобного модуля, конформационные и химические аспекты каталитических актов, совершаемых в циклооксигеназных и пероксидазных активных центрах и ряда других, представляющих общий интерес, теперь могут опираться на конкретные структурные данные.

III. Белки иммунной системы

Хотя белки иммунной системы являются мембранными, тем не менее, принимая во внимание их функциональные особен-

ности, целесообразно рассмотреть последние достижения рентгеноструктурного анализа в изучении их пространственного строения в отдельном разделе.

В 60-х годах было установлено, что два основных типа иммунных реакций осуществляются различными видами лимфоцитов — Т и В. Ответственные за клеточный иммунитет Т-лимфоциты размножаются в тимусе, центральной лимфоидной ткани. Вырабатывающие антитела и ответственные за гуморальный ответ В-лимфоциты образуются у млекопитающих из стволовых клеток кроветворной ткани, а у птиц — в фабрициевой сумке. Далее они мигрируют с током крови в периферические лимфоидные ткани. Иммунный ответ клеточного типа означает пролиферацию специализированных клеток, реагирующих на чужеродные антигены, которые разрушаются или непосредственно на поверхности образовавшихся клеток, или с помощью других клеток, таких как макрофаги. Гуморальный ответ заключается в активации синтеза антител, циркулирующих в жидких средах организма и специфически взаимодействующих с чужеродными молекулами. Связывание антитела с антигеном облегчает поглощение последнего фагоцитами и часто активирует особую систему белков крови, систему комплемента, которая способствует разрушению антигена.^{24,25} Одна из функциональных проблем иммунологии связана с изучением на атомно-молекулярном уровне механизмов узнавания и ответных реакций иммунной системы на появление в организме инфекционных антигенов — чужеродных белков, вирусов, бактерий, патогенных веществ.

Специфичность антигенной реакции лимфоцитов, согласно теории клональной селекции Бернета,^{26,27} обусловлена наличием на поверхности Т- и В-клеток рецепторных белков, избирательно взаимодействующих с определенными антигенами.

Известно, что Т-лимфоциты при стимуляции антигеном начинают интенсивно делиться и превращаться в активные клетки-эффекторы. В зависимости от выделяемых ими на клеточной поверхности антител они могут быть разделены, по крайней мере, на три группы.²⁸ Первую группу составляют цитотоксические клетки, которые, реагируя с чужеродными вирусными антигенами, убивают зараженные клетки до начала репликации вируса. Молекулярный механизм, обуславливающий гибель клетки-мишени пока не выяснен. Тем не менее известно, что для этого необходим непосредственный контакт между цитотоксическим Т-лимфоцитом (клеткой-киллером) и инфицированной клеткой (клеткой-мишенью).²⁹ Во вторую группу активированных Т-лимфоцитов входят так называемые Т-хелперы, клетки-помощники, необходимые как В-, так и Т-клеткам для создания соответственно гуморального и клеточного иммунного ответа, а также активации макрофагов. Наконец, третью группу образуют Т-супрессоры, способные подавлять ответы В-клеток или других Т-клеток на антигены. Замечено, что Т-супрессоры, как и большинство Т- и В-лимфоцитов, функционируют только в том случае, если их непрерывно побуждают к этому Т-хелперы, которые, активируя Т-клетки супрессора, сами ингибируются. Такая обратная связь в сложной сети взаимодействий лимфоцитов обеспечивает саморегуляцию активности клеток обоих типов.

Большая часть Т-лимфоцитов узнает чужеродные агенты, если они ассоциированы на клеточных поверхностях с мембранными гликопротеинами, которые кодируются генами главного комплекса гистосовместимости (major histocompatibility complex, МНС).³⁰ Существуют два класса молекул МНС, I и II, каждый из которых представляет собой набор гликопротеинов клеточной поверхности.^{31–33}

Узнавание Т-лимфоцитами антигена, ассоциированного с гликопротеинами МНС на поверхности клетки-мишени, осуществляется Т-клеточным антигенным рецептором (TCR) и одним из трансмембранных белков, CD₄ или CD₈,

являющихся корецепторами TCR.^{34–36} Предполагается, что невалентный комплекс образуется за счет стабилизирующих контактов между вариабельными участками молекулы TCR, антигеном и полиморфными участками МНС, а также между мембранным белком CD₄ (или CD₈) и неполиморфными областями МНС класса II (или класса I) соответственно. Для скоординированных взаимодействий TCR и CD₄ (или CD₈) с белками МНС клеток-мишеней требуется определенная совокупность свойств Т-клеток, которые появляются во время развития лимфоцитов в тимусе, их дифференциации и созревания.^{37–43}

Взаимодействие CD₈ с молекулами МНС-I запускает внутриклеточную сигнальную систему через белок p56^{lck}, src-связанную тирозинкиназу, непосредственно ассоциированную в липоидных клетках как с CD₄, так и CD₈.⁴⁴ В этом случае комплекс CD₈–p56^{lck} может функционировать практически так же, как и рецепторы фактора роста, в которых связь с внутриклеточным доменом активирует внутриклеточную тирозинкиназу.

Рентгеновские данные о трехмерных структурах мембранных белков и их отдельных доменов, участвующих в функционировании Т-клеточной иммунной системы, начали появляться лишь в 90-х годах. Поскольку речь идет главным образом о структурах мембранных белков, то использование метода рентгеновской дифракции в клеточной иммунологии сталкивается с большими препаративными трудностями, не в полной мере еще преодоленными. Впрочем, ситуация аналогична и во всех других направлениях молекулярной биологии, имеющих дело с изучением явлений, протекающих на поверхности клеток. Поэтому при оценке обсуждаемых ниже результатов рентгеноструктурного анализа следует учитывать, что они означают только начало широкого проникновения метода в проблематику Т-клеточной иммунологии.

1. Структура внеклеточного фрагмента корецептора CD8 Т-лимфоцитов

Белок CD8 обнаружен на поверхности Т-клеток в виде двух форм: дисульфидсвязанных гомодимера α_2 и гетеродимера $\alpha\beta$ (см.²⁷). Обе формы имеют N-концевые внеклеточные домены, которые по аминокислотным последовательностям и структурным особенностям подобны вариабельным доменам иммуноглобулина Ig-V (см.^{45,46}). Схематически гомодимер α_2 CD8 представлен на рис. 5. Внеклеточная область CD8 включает 162 остатка, из которых 114 образуют N-концевой иммуноглобулиновый домен, соединенный с трансмембранным участком цепью из 48 остатков. Внутриклеточная область состоит из высокополярной аминокислотной последовательности, непосредственно взаимодействующей с тирозинкиназой p56^{lck}. Трехмерная структура большей части внеклеточной полипептидной цепи корецептора человека CD8, протяженностью в 146 остатков (CD8-146) была установлена в работе⁴⁷ с разрешением 2,6 Å. Используемые для определения структуры кристаллы имели необходимые размеры и давали удовлетворительную дифракционную картину только после обработки белкового препарата нейраминидазой, О-гликозидазой и V8-протеазой. В найденной структуре CD8-146 общий характер свертывания полипептидной цепи N-концевого домена оказался идентичным вариабельным доменам иммуноглобулина Ig-V. Его пространственная структура также содержит, как видно из рис. 6, два антипараллельных β -складчатых листа из пяти и четырех β -тяжей, соединенных петлями той же топологии. Два домена фрагмента CD8-146 образуют подобный иммуноглобулину F_v гомодимер с осью симметрии второго порядка. Карты электронной плотности, однако, не позволили идентифицировать геометрию следующего за N-концевым доменом фрагмента 115–141. Отсутствие в дифрак-

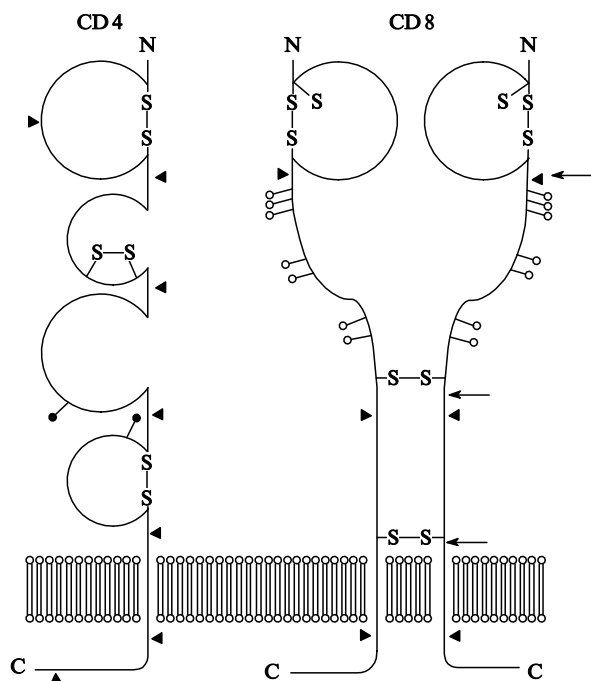


Рис. 5. Схемы рецептора CD4 и гомодимера рецептора CD8. Каждый большой круг соответствует иммуноглобулиновому домену; светлые кружки означают потенциальные места O-гликозилирования, а темные — N-гликозилирования; стрелки показывают концы экспрессии, а темные треугольники — границы интронных последовательностей⁴⁷

ционной картине соответствующих четких отражений свидетельствует о неупорядоченном состоянии этого фрагмента в кристалле.

Совместное рассмотрение ставшего известным пространственного строения домена CD8 и установленной ранее Бьеркманом и соавт.⁴⁸ кристаллической структуры белка МНС-I (HLA-A2) выявило наличие стерической и электростатической дополнительной профилей потенциальных поверхностей обоих полипептидов и позволило воссоздать их невалентный комплекс и сконструировать соответствующую

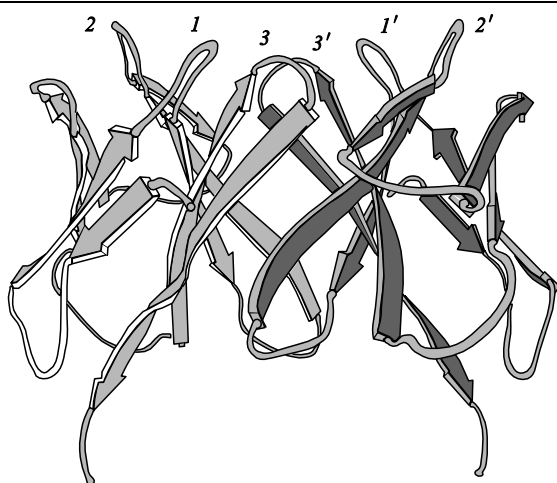


Рис. 6. Ленточная схема трехмерной структуры гомодимера CD8-146. Цифрами 1, 2, 3 и 1', 2', 3' обозначены CDR-1, CDR-2 и CDR-3-подобные петли двух субъединиц⁴⁷

щую атомную модель. Двойной комплекс был дополнен еще одним участником — Т-клеточным рецептором (TCR), поверхность которого, по-видимому, комплементарна остающемуся вакантным пептид-связывающему желобу молекулы HLA-A2 клетки-мишени. Таким образом, авторы работы⁴⁷ пришли к выводу, что в анти тело-антигенном комплексе с двух клеток домен CD8 и TCR одновременно связаны с одной и той же молекулой МНС-I, а второй домен димера-CD8 — с другой молекулой МНС-I. Такая схема взаимодействий рецепторов клетки-киллера с молекулами МНС-I клетки-мишени согласуется с экспериментальными данными.⁴⁹

2. Структура внеклеточного фрагмента рецептора CD4, содержащего домены 3 и 4

Ранее полагали, что пространственное строение молекул рецепторов CD4 и CD8 весьма близко, а поэтому их взаимодействия с молекулами МНС класса II и класса I должны оказывать одинаковое воздействие на активацию и развитие Т-лимфоцитов.⁵⁰ Однако кристаллографические исследования CD4 (см.^{51, 52–54}) и CD8 (см.⁴⁷) показали, что трехмерные структуры этих белков, во всяком случае во внеклеточной области, существенно отличаются друг от друга. Главные различия касаются двух моментов. Во-первых, N-концевой Ig-V-подобный домен CD4 функционирует в мономерном состоянии, а N-концевой домен CD8 образует F_v-подобный гомодимер. Во-вторых, структура CD4 во внеклеточной области состоит из четырех, в значительной мере автономных доменов, а CD8 — только из одного домена, который соединен с трансмембранной частью рецептора практически ненаблюдаемым в дифракционной картине и, по-видимому, лабильным участком из 48 аминокислотных остатков. Единственная структурная особенность, присущая как CD4, так и CD8, и отсутствующая в иммуноглобулиновых вариабельных доменах — длина петли CDR2 на 6 аминокислотных остатков больше. Функциональное значение такого локального изменения последовательности остается неясным.

Остановимся более подробно на пространственном строении рецептора CD4. Молекула CD4 — трансмембранный гликозилированный белок. Он находится на поверхности Т-лимфоцитов той субпопуляции, которая распознает клетки-мишени с антигенами, ассоциированными с белками МНС-II,²⁷ подобно тому как другая субпопуляция Т-лимфоцитов с молекулами CD8 на поверхности распознает чужеродные клетки с антигенами, связанными с белками МНС-I.^{55–57} Цитоплазматическая область CD4 тесно контактирует с тирозинкиназой p56, играющей важную роль в запуске производства Т-клеток. Молекула CD4 является основным рецептором, взаимодействующим с вирусом иммунодефицита человека (HIV-1),^{58–61} о чем подробно говорится в гл. VI.

На основе данных анализа аминокислотных последовательностей CD4 и иммуноглобулинов было предсказано, что внеклеточная часть рецептора состоит из четырех доменов, отнесенных к суперсемейству IgSF (см.^{58, 62}). Предположение вскоре подтвердилось результатами прямых структурных исследований. Правда, все попытки провести рентгеноструктурный анализ целой внеклеточной части молекулы из 371 остатка не увенчались успехом из-за ее плохой кристаллизации. Однако удалось получить кристаллы, дающие вполне удовлетворительную картину рентгеновской дифракции, которые образовывались из двух половин этой части последовательности CD4 по отдельности. Каждый из кристаллических образцов включал по два домена — D1D2 (см.^{52, 53}) и D3D4.^{51, 54} При кристаллографическом исследовании D3D4 была использована криотехника, которая позволила установить трехмерную структуру с разрешением 2.6 Å; при комнатной температуре разрешение составляло 2.8 Å. Замораживание кристаллов до –150°C сопровождалось 1–2%-ным

уменьшением размеров элементарной ячейки без нарушения группы симметрии. Среднеквадратичное отклонение атомов C^α аминокислотных остатков при изменении температуры от комнатной до -150°C оказалось равным $0.86\text{ \AA}$ (0.93 для домена D3 и $0.57\text{ \AA}$ для D4). Сопоставление трехмерных структур четырех доменов показывает, что пространственное строение последовательностей имеет ряд общих черт, причем домен D1 обладает большим сходством с D3, а D2 — с D4. Различия в геометрии D3D4 по сравнению с D1D2 заключаются, во-первых, в увеличенном расстоянии у D3 между β -складчатыми листами, что, очевидно, связано с отсутствием в этом домене дисульфидной связи, и, во-вторых, в изменении на $\sim 25^\circ$ взаимной ориентации доменов D3 и D4 относительно ориентации D1 и D2.

В модели всей внеклеточной части рецептора CD4, предложенной Ланге и соавт.⁵¹ на основе известных трехмерных структур D1D2 и D3D4 и согласующейся с рядом косвенных данных,^{63,64} четыре домена образуют стержнеобразную форму длиной $\sim 120\text{ \AA}$, что равно приблизительно сумме длин двух фрагментов D1D2 ($65\text{ \AA}$) и D3D4 ($60\text{ \AA}$). Конформация промежуточного участка из трех остатков (179–181) осталась неустановленной. У фрагмента D1D2 эти остатки являются С-концевыми и, обладая, по-видимому, значительной подвижностью в кристалле, не проявляются на картах электронной плотности. В предложенной модели CD4 (D1D2D3D4) N-концевые участки доменов D1 и D2 доступны для установления контактов с белками МНС-II, а некоторые участки поверхностей доменов D3 и D4 имеют возможность взаимодействовать с белками Т-клеточного рецепторного комплекса собственного лимфоцита; впрочем, структуры двух компонент пока неизвестны.

3. Структура антигена HLA-DR1 класса II

МНС-Антигены человека — HLA (human leukocyte antigen) — были впервые обнаружены на лейкоцитах. Аналогично МНС, антигены комплекса HLA делятся на два класса, I и II, представляющих набор гликопротеинов клеточной поверхности. Как уже отмечалось при трансплантационных реакциях цитотоксические Т-клетки в основном отвечают на чужеродные гликопротеины класса I, а Т-хелперы — на чужеродные гликопротеины класса II. Молекулы HLA-II являются трансмембранными $\alpha\beta$ -гетеродимерными белками с молекулярной массой 60 кДа . Первоначально они экспрессируются специальными антигенпроизводящими клетками, такими как макрофаги, стволовые клетки и В-лимфоциты. Класс II антигена HLA объединяет белки, превращающиеся из внеклеточных антигенов в хелперы Т-клеток в процессе идентификации чужеродных антигенов и иммунных ответов.^{65,66} У человека молекулы этого класса полиморфны, и поэтому могут специфически взаимодействовать с наборами разных белков. Полиморфизм HLA, по-видимому, обуславливает отличающиеся иммунные ответы различных индивидуумов на действия одних и тех же чужеродных агентов; с ним же связаны разная восприимчивость к болезням, нарушение толерантности к собственным антигенам и возникновение аутоиммунных реакций.^{67,68}

Кристаллы выращены в водном растворе HLA-DR1 класса II, принадлежащего нескольким вариантам аллелей. Предварительно белок был очищен с помощью иммуноаффинной хроматографии и детергентов, освобожден от трансмембранной области и цитоплазматического домена действием папаина.^{69,70} Трехмерная структура внеклеточной части HLA-DR1 была определена с разрешением $3.3\text{ \AA}$ путем комбинации данных рентгеновской дифракции, полученной от трех различных образцов.⁷⁰ Во всех случаях белок кристаллизовался как димер DR1 $\alpha\beta$ -гетеродимера. Найденная структура оказалась подобной молекулярной структуре HLA-I (см.⁷¹) и отвечающей гипотетической модели пептид-связывающего центра этого белка, сконструированного по

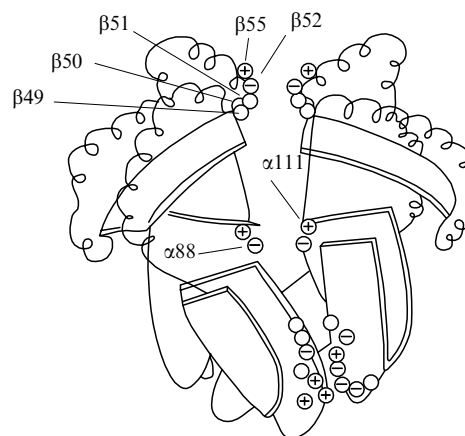


Рис. 7. Области контактов субъединиц α, β -гетеродимера HLA-DR1 класса II⁷⁰

кристаллографическим данным о пространственном строении HLA-A2 класса I (см.⁷²). Трехмерная структура мономерной единицы HLA-DR1 класса II в $\alpha\beta$ -гетеродимере состоит из двух α -спиральных доменов и двух β -структурных доменов, β_1 и β_2 . Молекулу пересекает длинная пептид-связывающая щель, дно которой выстлано восемью тяжами антипараллельного β -листа, а стенки — двумя антипараллельными спиральными участками. Между молекулами DR1 в димере имеются четыре контактные области (рис. 7). Две из них расположены вблизи оси вращения второго порядка и включают взаимодействия остатков 49–55 (β_1) и 88 — 111 (α_2). Другие две контактные области, наиболее удаленные от мембраны, образованы пятью парами аминокислотных остатков двух сближенных β_1 -доменов. Кристаллическая структура DR1 (см.⁷⁰) допускает образование комплекса с CD4, предположенного ранее на основе исследования мутантных производных.⁷³ Если при Т-клеточном узнавании DR1 он находится в димерной форме, то, как свидетельствует рентгеноструктурный анализ белка, α_2 -домен второй молекулы димера может также контактировать с CD4, дополнительно усиливая взаимодействия DR1 с CD4.

Браун и соавт.⁷⁰ предложили гипотетический механизм сборки антиген-специфического межклеточного комплекса HLA-II, TCR и корецептора CD4. Предполагается, что на первой стадии $\alpha\beta$ -Т-клеточный рецептор и его ассоциированные CD3 и субъединицы образуют слабые димеры, подобные димерам DR1, которые до появления комплекса DR1 – TCR не являются стабильными. Комплекс становится необратимым как только молекулы DR1 связываются со специфическим пептидом посредством TCR. Окончательная стабилизация комплекса создает условия для возникновения эффективных взаимодействий четырехдоменного корецептора CD4 одновременно с обоими мономерами TCR и белками МНС-II. Ассоциация CD4 означает включение сигнальной системы для запуска иммунного ответа клеточного типа.

4. Структура комплекса HLA-DR1 — пептид

Антигены главного комплекса гистосовместимости (МНС или у человека HLA) являются трансмембранными гликопротеинами. Они связывают пептиды внутри клетки в цитоплазматическом пространстве и доставляют их во внеклеточное пространство, где они становятся доступны Т-клеткам, участвующим в механизме функционирования иммунной системы, идентификации чужеродного антигена и ответа на его появление.^{74,75} Взаимодействие Т-клеточного рецептора антигена с ассоциированным на МНС (HLA) пептидом стимулирует в Т-клетке экспрессию белков главного центра

гистосовместимости. Индивидуальный организм имеет небольшой набор разновидностей таких белков. Между тем факты свидетельствуют о том, что каждый из них обладает способностью связывать огромное количество патогенных пептидов и сигнализировать о необходимости ответных действий. Кажущееся противоречие разрешается благодаря широкому полиморфизму молекул белков МНС, т.е. лабильности их трехмерных структур или, иными словами, возможности принимать отдельными, преимущественно поверхностными участками белковой глобулы большое число разнообразных конформационных состояний. Полиморфизм формирующих связывающие центры аминокислотных остатков белков МНС класса I и класса II обуславливает их легкую адаптируемость к пептидам различных последовательностей. Однако это не исключает специфичности взаимодействий. Белки МНС-I, как правило, ассоциируются с пептидами небольшой длины, обычно в 10 остатков, и отличаются высокой избирательностью к природе аминокислот во вполне определенных местах олигопептидной последовательности при толерантности к природе всех других участков цепи.^{76–78} Белки МНС-I функционируют в эндоплазматическом ретикулеуме, где параллельно идет интенсивный процесс генерирующего пептиды протеолиза. Белки МНС-II действуют в эндосомальных и липосомальных компартментах, в которых также одновременно идет протеолиз. Обычно представители этого класса связывают более длинные пептиды и также демонстрируют высокую чувствительность к локализации в последовательности различных аминокислот.^{79–82}

Результаты рентгеноструктурного анализа внеклеточных частей нескольких белков HLA-I человека^{83–86} и МНС-I мыши^{87,88} свидетельствуют о наличии общего механизма пептидного связывания белками класса I. В структурах всех исследованных пептид-белковых комплексов пептиды имели сходные конформации, стабилизированные в центрах связывания в принципе одной и той же системой водородных связей и специфическими дисперсионными взаимодействиями боковых цепей нескольких остатков ассоциированного пептида с комплементарными им гидрофобными карманами белковой глобулы.^{86–92}

О связывании пептидов с белками МНС (HLA) класса II можно судить по результатам рентгеноструктурного исследования, проведенного Штерном и соавт.⁹³, пространственного строения комплекса внеклеточной части белка HLA-DR1 с пептидом вируса гриппа HA — тридекапептидным фрагментом (306–318) гемагглютинаина, мембранного гликопротеина этого вируса. Дифракционная картина получена от одного кристалла при -170°C , используя синхронное излучение с $\lambda = 0.910 \text{ \AA}$. Трехмерная структура комплекса HLA-DR1 — HA определена с разрешением $2.75 \text{ \AA}$.

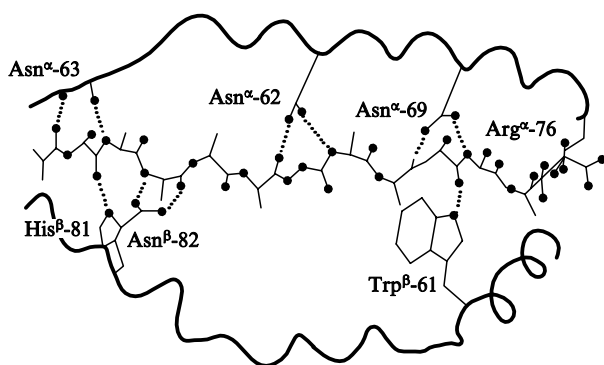


Рис. 8. Схема водородных связей между пептидом и пептид-связывающим центром комплекса HLA-DR1 — HA

Тридекапептид HA сорбирован в связывающем центре HLA-DR1 в вытянутой, закрученной с большим шагом форме. Она представляет наилучшие возможности для взаимодействий, с одной стороны, с окружающими пептид аминокислотными остатками, а с другой, с поверхностными остатками Т-клеточного рецептора. Таким образом, пептид открыт для межклеточных взаимодействий. Схема реализуемых в комплексе HLA-DR1 — HA 12 водородных связей показана на рис. 8. Связи осуществляются только между атомами основной цепи пептида HA и атомами консервативных аминокислотных остатков α -спиральных и β -структурных областей HLA-DR1. Следовательно, система водородных связей не зависит от конкретной последовательности пептида, т.е. является универсальной для пептидных комплексов HLA-DR1 класса II. Этот факт свидетельствует также о близких ориентациях пептидов в комплексах одновременно относительно связывающих центров белков HLA-DR1 и TCR, принадлежащих двум клеткам.

IV. Аспаргатные протеазы

Рассмотренные в гл. II и III первые попытки решить с помощью рентгеновской дифракции проблему структурной организации мембранных белков завершились относительным успехом. Для ряда трансмембранных рецепторов и антиген-специфических комплексов Т-лимфоцитов были установлены трехмерные структуры периплазматических доменов, содержащих лиганд-связывающие центры. Дальнейшее развитие работ этого направления должно привести к определению пространственного строения целых рецепторных молекул, включающих также трансмембранные и цитоплазматические домены. В конечном счете будет создан атомно-молекулярный фундамент для теоретического и экспериментального изучения структурно-функциональной организации мембранных белков и механизмов их функционирования. Трудности на этом пути, имеющие главным образом методический характер, пока еще весьма велики.

Ниже рассматриваются последние достижения рентгеноструктурного анализа белков, знание пространственного строения которых для человека жизненно важно. Это — аспаргатные протеазы, прежде всего протеаза вируса иммунодефицита человека (HIV-1) и ренин, один из главных участников системы регуляции тонуса стенок кровеносных сосудов, скелетных мышц и других тканей. Становится все более очевидным, что поиск радикальных терапевтических средств борьбы с синдромом приобретенного иммунодефицита (AIDS), другими видами вирусных заболеваний, а также гипертонией, т.е. решение сугубо прикладных медико-биологических задач экстраординарной важности, требует высокого уровня развития теоретической молекулярной биологии. Необходимой, хотя и не в полной мере достаточной, предпосылкой для его достижения является информация о трехмерных структурах соответствующих белковых молекул. В отличие от структурных исследований мембранных рецепторов, сдерживающим моментом здесь служат не трудности выделения, очистки и кристаллизации белков, а сложности более принципиального характера.

Перед рассмотрением результатов рентгеноструктурного анализа молекул протеазы HIV-1, принадлежащего семейству РНК-содержащих вирусов (*Retroviridae*), и ренина (протеолитического фермента млекопитающих), которые привлекли к себе в последние годы исключительное внимание как перспективные терапевтические мишени, кратко остановимся на общем состоянии структурных исследований аспаргатных протеаз.

Первые кристаллические структуры аспаргатных протеаз стали известны в 1977 г., когда были опубликованы данные рентгеноструктурного анализа строения молекул сразу четырех ферментов: пепсина, пенициллопепсина, эндотиопепсина и ризопуспепсина (табл. 1). Структуры были определены с

Таблица 1. Рентгеноструктурный анализ нативных аспартатных протеаз и их ингибиторов

Фермент	Ингибитор	Разрешение, Å	Ссылки
Пепсин	— AcPhe—TyrOMe	2.7, 2.3, 2.0, 1.8 3.0	94–98 99
Пепсиноген	—	1.8	100, 101
Химозин	—	2.3	102–104
Ренин	— His—Pro—Phe—His—Leu—Leu—Tyr—Tyr—Ser	2.5, 2.8 2.5, 2.4, 2.6, 2.0	105, 106 106–109
Пенициллопепсин	— Iva—Val—Val—Lysta—OEt	2.8, 1.8 2.6, 1.8	110–112 113, 114
Эндотиапепсин	— Pro—Thr—Clu—Phe(CH ₂ NH)Phe—Arg—Glu Boc—Thr—His[NHCH(CH ₂ Ph)CH(OH)N(CH ₂ CHMe ₂)CO]Lys—Phe Boc—His—Pro—Phe—His—Sta—Leu—PheNH ₂	3.0, 2.4, 2.1 2.0 1.8 2.2	115–117 118 119 120
Ризопуспепсин	— AcVal—Sta—Ala—StaOH D—His—Pro—Pro—Phe—His—Phe(CH ₂ NH)Phe—Val—Tyr	2.5, 1.8 2.5 1.8	115, 121 122, 123 124
Протеиназа вируса птичьего миеобластоа (BMV)	—	2.4	125
Протеиназа вируса саркомы Роуза (RSV)	—	2.0	126
Протеиназа вируса иммунодефицита человека (HIV-1)	— Val—Ser—Gln—Asn—Leuψ[CH(OH)CH ₂]Val—Ile—Val (U-85548e) AcSer—Leu—Asn—Pheψ[CH(OH)CH ₂]Pro—Ile—Val—OMe (JG-365) AcThr—Ile—Nle—CH ₂ —Nle—Gln—Arg—NHMe (MVT-101) PR ^a —Gly—Gly—Ser—Ser—Gly—PR	2.0, 2.8 2.5 2.4 2.3 1.8	127, 128 129 130 131 132

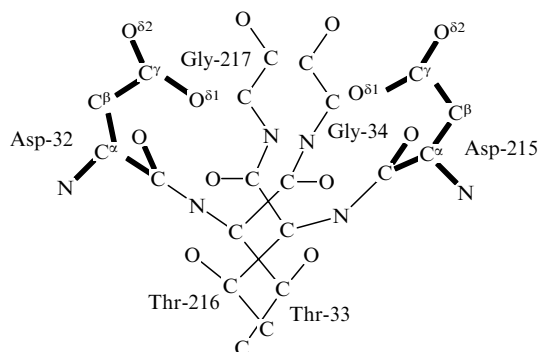
^a PR — протеиназа HIV-1.

разрешением 2.5–3.0 Å. Прошло около десяти лет, пока разрешение удалось довести до 1.8–2.1 Å, которое уже с достаточной надежностью позволило судить о деталях строения как самих ферментов, так и взаимодействующих с ними молекул ингибиторов и воды. За это время были расшифрованы структуры еще двух аспартатных протеаз — химозина и ренина, а также структуры ряда ингибиторных комплексов четырех упомянутых выше ферментов.

Рентгеноструктурный анализ показал, что, несмотря на существенное различие в последовательностях аминокислот, пространственное строение молекул аспартатных протеаз животных и микроорганизмов сходно. Все они построены из двух симметрично расположенных и почти целиком состоящих из β-структур доменов. Оба домена воспроизводят один и тот же структурный мотив и содержат попадающие в активный центр фермента участки Asp—Thr—Gly. В контактной области домены образуют щель, пересекающую большую часть глобулы белка. В центре щели находятся оба каталитически важных остатка Asp-32 и Asp-215 (нумерация пепсина), карбоксильные группы которых сближены друг с другом и с несколькими другими остатками, а также и с молекулами кристаллизационной воды. Система стабилизирована сетью водородных связей, электростатическими и дисперсионными взаимодействиями (рис. 9).

Исследования трехмерных структур комплексов аспартатных протеаз с субстратоподобными ингибиторами (см. табл. 1) позволили идентифицировать для каждого фермента места активного центра и соотнести их с участками субстрата, ответственными за первичную и вторичную специфичность ферментативной реакции. Сопоставление структур

нативных протеаз с их ингибиторными комплексами показало, что связывание олигопептидных лигандов, незначительно отличающихся от субстратов, сопровождается поворотом одного домена относительно другого на ~4° и его смещением на ~0.3 Å вдоль оси, проходящей через C^α-атомы остатков Asp-32 и Asp-215. Изменение во взаимной ориентации доменов приводит к уплотнению щели и заметной деформации активного центра, увеличению расстояния между некоторыми остатками на ~2.0 Å и смещению боковых цепей до 3.5 Å. Было предположено, что такие изменения

**Рис. 9.** Каталитически важные остатки активного центра аспартатных протеиназ

необходимы для протекания ферментативной реакции и, следовательно, происходят также при образовании фермент-субстратных комплексов.¹³³

Представление о чисто химических аспектах ферментативных реакций аспартатных протеаз сформировалось еще до становления кристаллографии белков. Детальные исследования неферментативного гидролиза разнообразных эфиров, амидов и модельных пептидов, проведенные главным образом в 60-е годы, показали, что катализ оказывается эффективным лишь в среде, включающей следующие три компонента: нуклеофил, атакующий карбонильный углерод расщепляемой пептидной связи, основной катализатор, способствующий отщеплению протона от нуклеофила, и кислотный катализатор, обеспечивающий протонирование уходящей группы.¹³⁴ Эти же исследования, а также изучение кинетики и термодинамики ферментативных реакций протеаз позволили прийти к еще одному важному выводу общего характера: собственно химические механизмы действия всех протеолитических ферментов могут быть сведены к двум типам — ковалентному катализу и общему основному катализу. В первом случае инициирующим ферментативную реакцию компонентом является нуклеофил белковой молекулы, непосредственно взаимодействующий с субстратом и образующий с ним промежуточные ковалентные соединения. В реакциях протеолитического гидролиза второго типа фермент во время всего каталитического акта не образует ковалентных соединений с субстратом. Его нуклеофильная атомная группировка выступает в этом случае как основной катализатор, который, взаимодействуя с молекулой воды, депротонирует ее и тем самым превращает в эффективный нуклеофил, непосредственно атакующий карбонильный углерод расщепляемой пептидной связи.

Использование Антоновым, Гиодманом и соавт.^{134–137} метода, основанного на включении атома тяжелого кислорода молекулы H_2^{18}O в продукты ферментативных реакций, сыграло, по-видимому, решающую роль в установлении типа каталитической реакции аспартатных протеаз. Проведенные впервые¹³⁴ сопоставительные исследования гидролиза, катализируемого различными амидгидролазами, показали, что сериновые и цистеиновые протеазы функционируют по ковалентному типу, а аспартатные и металлодержателе — по типу общего основного катализа. Этот вывод согласуется с наиболее однозначно трактуемыми результатами химических, кинетических и термодинамических исследований каталитических реакций эндопротеаз. Он был подтвержден позднее данными рентгеноструктурного анализа ферментов и в настоящее время является общепризнанным.

1. Структура аспартатной протеазы HIV-1

Интерес к механизму действия аспартатных протеаз особенно возрос в последнее время в связи с обнаружением ферментов этой группы у ретровирусов, вызывающих в организмах человека и животных такие болезни, как AIDS, некоторые виды лейкозов, сарком и онкоопухолей молочных желез. Очень важно, что аспартатные протеазы этих вирусов играют ключевую роль в их жизненных циклах.^{138–141} В клетке-хозяине они гидролизуют белки ядерных капсид, окружающих вирусные РНК, расщепляют полибелковые цепи на зрелые структурные белки и ферменты, участвующие в репликации ретровирусов. Вирусные протеазы в состоянии также гидролизовать белки инфицированных клеток, нарушая тем самым целостность их структурно-функциональной организации. В то же время клеточные протеолитические ферменты не обладают способностью расщеплять вирусные протеазы и выполнять их функции. Таким образом, в отсутствие протеаз или при их ингибировании вирусы иммунодефицита человека (HIV-1, HIV-2) и обезьяны (SIV), а также опухолеродные вирусы не смогли бы обрести

инфекционные формы. По этой причине протеазы ретровирусов стали объектами столь пристального внимания энзимологов и медиков.

Аспартатные протеазы ретровирусов уже через 2–3 года после их открытия стали одними из наиболее тщательно экспериментально изученных ферментов. Основное внимание было уделено аспартатной протеазе HIV-1, о структуре и функции которой сейчас известно, пожалуй, больше, чем о таком классическом объекте, как пепсин, открытом еще в 1836 г.

Последовательность протеазы HIV-1 состоит из 99 аминокислотных остатков, тогда как аспартатные протеазы позвоночных и микроорганизмов содержат их более трехсот. В ней встречается фрагмент Asp–Thr–Gly, присутствующий в каждом домене у всех пепсиноподобных ферментов. Согласно¹⁴² физиологически активная форма HIV-1 протеазы включает две молекулы, ассоциированные посредством невалентных взаимодействий. Это предположение было проверено экспериментально.¹⁴³ Методами генной инженерии была синтезирована полипептидная цепь из 203 аминокислотных остатков, составляющих две молекулы HIV-1-протеазы, C- и N-концы которых соединены пентапептидным участком Gly–Gly–Ser–Ser–Gly. Такой валентно-связанный димер в физиологических условиях спонтанно принимал конформацию нативного димера и обладал идентичной с ним активностью. Этот вывод недавно нашел подтверждение в работе¹³², определившей трехмерную структуру аналогичным образом связанного димера протеазы HIV-1 с разрешением 1.8 Å. При замене одного из двух каталитически важных остатков Asp-25 на Gly активность пропадает. К тем же результатам привело и другое исследование¹⁴⁴ валентно-связанного димера HIV-1 протеазы с дипептидным мостиком Gly–Gly и заменой Asp-25 на Asn и Glu.

Томассели и соавт.¹³⁹ определили константу диссоциации нативного димера протеазы HIV-1, которая оказалась равной 2 пМ. Согласно данным работы¹⁴³, ее величина составляет 50 пМ. Несмотря на значительное расхождение найденных констант диссоциации, можно тем не менее полагать, что димеризация протеазы HIV-1 происходит в наномолярной области, т.е. при концентрации много ниже той, которая существует в вирусной частице. Исследование¹⁴⁵ показало, что каталитическая активность протеазы HIV-1 подавляется пепстатиновыми ингибиторами, что характерно для всех аспартатных протеаз. Там же отмечено, что замена в последовательности вирусной протеазы остатка Asp-25 на Thr ведет к полной потере активности. Тот же эффект наблюдается при замене в последовательности протеазы HIV-1 остатка Asp-25 на Asn (см.^{140, 145}), Ala (см.^{146, 147}), Tyr и His (см.¹⁴⁶). Активность падает до нуля также у пепсина в случае подобного мутагенеза одного из его каталитических остатков Asp (см.¹⁴⁸).

Таким образом, можно утверждать, что физиологически активной является димерная форма протеазы HIV-1, в которой каталитически важную роль играют оба остатка аспарагиновой кислоты (Asp-25 и Asp-125). Лишь эта форма обладает всеми отличительными признаками аспартатных протеаз. Следовательно, димерная форма протеазы HIV-1, подобно пепсину, ренину, ризопуспепсину и другим ферментам данной группы, должна функционировать по типу общего основного катализа. В какой же мере вывод о едином химическом механизме каталитических реакций аспартатных протеаз подтверждается данными рентгеноструктурного анализа ретровирусных протеолитических ферментов.

В настоящее время известны трехмерные структуры трех аспартатных протеаз ретровирусов — HIV-1, RSV, BMV — и трех комплексов протеазы HIV-1 с субстратоподобными ингибиторами — U-85548e, JG-365 и MVT-101 (см. табл. 1). Все они являются димерами, структурно родственными друг другу и аспартатным протеазам из других источников. Более

Таблица 2. Расстояния (Å) между атомами боковых цепей Asp-32 и Asp-215 (нумерация пепсина) в кристаллических структурах аспартатных протеаз

Фермент	$O_{32}^{\delta 1}-O_{215}^{\delta 1}$	$O_{32}^{\delta 2}-O_{215}^{\delta 2}$	$C_{32}^{\gamma}-C_{215}^{\gamma}$	$O_{32}^{\delta 1}-O_{215}^{\delta 2}$	$O_{32}^{\delta 2}-O_{215}^{\delta 1}$	$C_{32}^{\beta}-C_{215}^{\beta}$	$C_{32}^{\alpha}-C_{215}^{\alpha}$	Ссылки
Пепсин	2.8	5.8	5.1	4.4	4.8	7.4	6.7	98
Ренин	2.9	6.2	5.3	4.8	4.8	7.4	6.6	105
Пеницилло- пепсин	2.9	5.8	5.2	4.4	4.8	7.5	6.6	112
Эндотиа- пепсин	2.9	5.7	5.2	4.4	4.8	7.6	6.6	117
Ризопус- пепсин	3.1	6.1	5.4	4.4	5.0	7.7	6.8	121
Протеаза HIV-1	3.0	5.8	5.2	4.7	4.7	7.4	6.6	128
Протеаза RSV	2.8	5.6	5.0	4.6	4.2	7.4	6.4	126

того, можно считать, что все известные протеазы имеют совпадающие по геометрии активные центры (подразумевается непосредственное место сорбции расщепляемой пептидной группировки). На это указывает близость в молекулах ферментов расстояний между соответствующими атомами двух функциональных остатков аспарагиновой кислоты (табл. 2). Таким образом, можно заключить, что ферментативные реакции аспартатных протеаз позвоночных, микроорганизмов и ретровирусов имеют одинаковые стартовые условия и, следовательно, должны протекать по одному и тому же, а именно основному, типу катализа.

На рис. 10 сопоставлены кристаллические структуры нативной молекулы протеазы HIV-1 и ее ингибиторного комплекса, а на рис. 11 приведена карта расстояний между атомами C^{α} (до 10 Å) двух ассоциированных молекул протеазы. Наибольший вклад в стабилизацию димера вносят невалентные контакты двух пар N-концевых (1–8, 101–108) и C-концевых (87–99, 187–199) фрагментов, образующих между собой многочисленные и разнообразные по природе контакты (дисперсионные, электростатические и посредством водородных связей). Укладка в процессе димеризации этой плотноупакованной и, по-видимому, наиболее стабильной части протеазы HIV-1 оказывает значительное и непосредственное влияние на формирование близкорасположенного активного центра. Взаимодействия более 40 аминокислотных остатков четырех концевых фрагментов весьма избирательны. На это указывает, например, отсутствие каталитической активности у димерного комплекса, составленного из смешанных цепей вирусов HIV-1 и HIV-2, имеющих близкую гомологию.¹⁴⁹ Для потери активности оказалось достаточно трех замен в положениях 6, 92 и 95 на

всех других участках, контактирующих в димере, последовательности ферментов двух вирусов совпадают.

В димерном комплексе протеазы HIV-1 сближены также фрагменты 23–28 и 123–128, которые включают эффективно взаимодействующие между собой трипептидные фрагменты — Asp-25–Thr-26–Gly-27 и Asp-125–Thr-126–Gly-127 — неперенные участники активных центров всех аспартатных протеаз. Эта контактная область двух молекул дополнительно стабилизирована невалентными взаимодействиями с остатками 7–9, 107–109 и 84–85, 184–185 соответственно N- и C-концевых фрагментов.

Наконец, есть еще одна область межмолекулярных взаимодействий димерной протеазы HIV-1. Ее составляют два β -складчатых листа, 45–57 и 145–157, нависающих подобно распластанным крыльям над активным центром и получивших название «флепов» (flap). В нативном состоянии ферментов они не участвуют в стабилизации димерной формы и удерживают свое положение взаимодействиями сближенных по отношению друг к другу пентапептидных участков 48–52 и 148–152 (см. рис. 10, 11), а также, по-видимому, за счет контактов с соседним в кристаллической решетке димером.

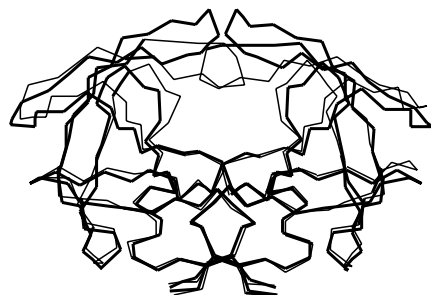


Рис. 10. Основные цепи нативной HIV-1 протеазы (жирная линия) и ее комплекса с ингибитором JG-365 (тонкая линия)

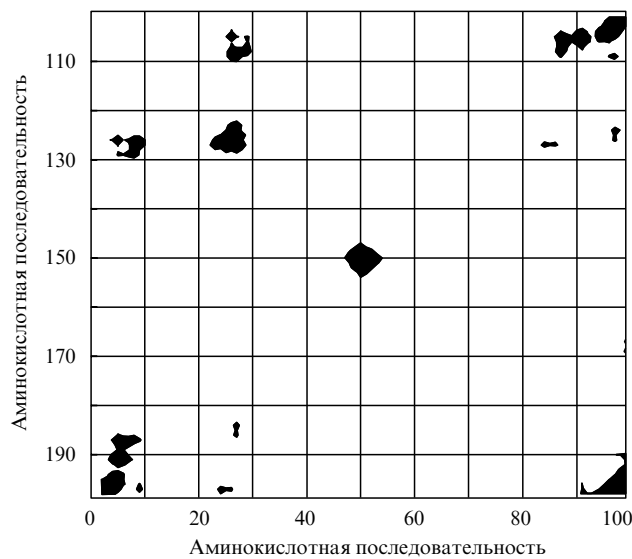


Рис. 11. Карта расстояний между атомами C^{α} молекул HIV-1 протеазы в гомодимере (зачерненные области соответствуют расстояниям < 10 Å)

Важную роль флепы играют на стадии образования невалентного комплекса. В процессе фермент-субстратных (ингибиторных) взаимодействий происходит огромная, не имеющая прецедентов в каталитических реакциях других ферментов (во всяком случае, протеолитических) конформационная перестройка значительной части нативной структуры. Она затрагивает не только боковые цепи остатков активного центра, что обычно имеет место, но и основные цепи обеих молекул протеазы HIV-1. Наибольшие изменения при комплексообразовании претерпевают как раз участки 45–57 и 145–157. Если судить по смещениям атомов C^α , то они достигают $\sim 8.0 \text{ \AA}$ у центральных остатков 50, 51 и 150, 151, постепенно затухая до $1.0 \text{ \AA}$ у концевых остатков β -структур 45, 57 и 145, 157 (рис. 12, *a*). Встречные концы флепов, как у консолей, смещаются к сорбированной в активном центре молекуле субстрата (ингибитора). Заметные перемещения ($2.0\text{--}3.0 \text{ \AA}$), также уменьшающие размеры полости активного центра, синхронно совершают фрагменты 77–81 и 177–181. Смещения атомов C^α у двух молекул протеазы HIV-1 в димерном комплексе близки, хотя и не идентичны.

Изменения в положениях флепов при образовании комплексов наблюдаются и у других аспартатных протеаз. Однако, как видно из рис. 12, *b*, на котором показаны смещения атомов C^α в фермент-ингибиторном комплексе ризопуспеписа, различия здесь менее значительны. Что же касается других участков основной цепи белка, то они практически не реагируют на ассоциацию с ингибитором.

Большой интерес, прежде всего при поиске антивирусных лекарственных препаратов, представляет знание процесса димеризации протеазы HIV-1. Особого внимания здесь заслуживает вопрос о том, происходит ли ассоциация молекул без изменения их пространственного строения, или этот процесс сопровождается конформационной адаптацией партнеров. Если изменения имеют место, то открывается

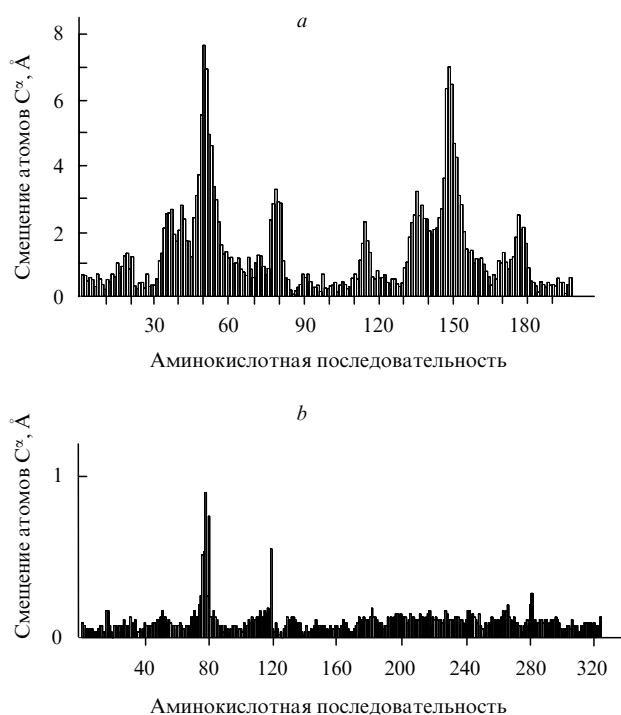


Рис. 12. Смещение атомов C^α в молекулах димерной HIV-1 протеазы при образовании невалентного комплекса с ингибитором JG-365 (*a*) и в молекуле ризопуспеписа при образовании невалентного комплекса с ингибитором (*b*)

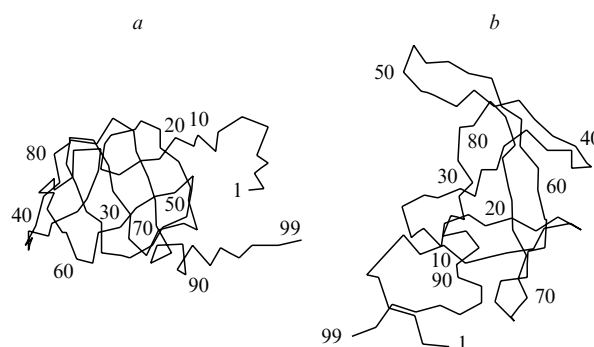


Рис. 13. Проекция (*a*, *b*) молекулы HIV-1 протеазы в димере

возможность воспрепятствовать образованию активного комплекса путем такого целенаправленного воздействия на молекулы фермента, которое сделало бы невозможным конформационные перестройки, необходимые для их объединения. Быть может, такое направление развития антивирусной терапии окажется наиболее перспективным в силу исключительности механизма образования активных форм ретровирусных протеаз по сравнению с аспартатными протеазами других источников.

Однако непосредственно наблюдать трехмерную структуру отдельной молекулы протеазы HIV-1, чтобы сопоставить ее со структурой субъединицы в димерном комплексе, не представляется возможным, поскольку фермент кристаллизуется лишь в форме димера. Поэтому для решения задачи остается теоретический путь: априорный расчет конформации свободной молекулы протеазы HIV-1 по известной аминокислотной последовательности.

На рис. 13 приведены проекции пространственной структуры одной из субъединиц в нативном димерном ассоциате, из которого видно, что первые девять N-концевых и последние шесть C-концевых остатков последовательности из-за своей удаленности не взаимодействуют ни друг с другом, ни с остальной частью молекулы. Развернутые конформационные состояния этих фрагментов наиболее благоприятны для межмолекулярных взаимодействий, которые они осуществляют в структуре каталитически активного димера протеазы HIV-1 (см. рис. 10 и 11). Выше отмечалось, что именно межмолекулярные контакты четырех концевых групп двух последовательностей вносят основной вклад в стабилизацию димера. В то же время развернутые формы участков 1–9 и 94–99 энергетически невыгодны для свободных молекул фермента, и их реализация в разбавленном растворе маловероятна. Следовательно, в процессе димеризации должен происходить конформационный переход от свернутых форм, выгодных для свободных молекул, к развернутым, предпочтительным для ассоциированных. Из рис. 13 очевидно, что одновременно должно изменяться также конформационное состояние флепа 45–57, которое в комплексе определяется взаимодействиями с флепом второй молекулы и, возможно, с димером смежной элементарной ячейки.

Из сказанного выше можно сделать вывод, что возможный путь поиска терапевтических средств защиты от ретровирусов, в частности, вируса иммунодефицита человека — создание препаратов, препятствующих димеризации молекул аспартатных протеаз. Без этого невозможно функционирование фермента, а следовательно, и реализация жизненного цикла вируса.

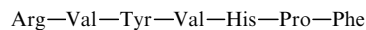
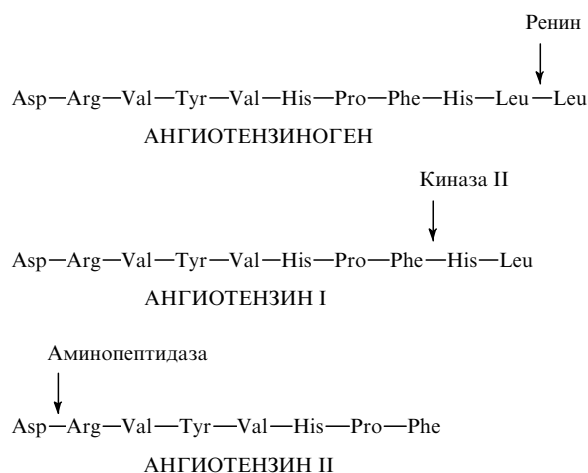
Другой подход к получению необходимых лекарств связан с созданием особых ингибиторов ретровирусных аспартатных протеаз. Это задача чрезвычайно сложна и на сегодняшний день еще не преодолена. Среди требований,

предъявляемых к свойствам ингибиторов, главное и самое трудновыполнимое касается избирательности их действия. Ингибиторы, обладающие терапевтическим эффектом, должны быть, прежде всего, высокоспецифичны до такой степени, чтобы, дезактивируя ретровирусную протеазу, не нарушать нормального функционирования как аспартатных, так и других протеолитических ферментов клетки-хозяина. Для целенаправленного поиска ингибиторов, удовлетворяющих этому требованию, необходимо располагать количественными данными о всех стадиях каталитического акта вирусной протеазы, аналогичными сведениями о механизмах функционирования протеаз инфицированной клетки и методом решения обратной структурной задачи, т.е. конструирования химического строения ингибитора по заданной пространственной форме. В связи с проблемой специфичности фермент-субстратных взаимодействий особое значение имеют прежде всего рентгеноструктурные данные о ренине, аспартатной протеазе плазмы крови.

Этот фермент в отличие не только от других аспартатных протеаз, но и вообще амидогидролаз, обладает практически абсолютной специфичностью. Известно, что ренин гидролизует лишь свой природный субстрат ангиотензиноген, отщепляя от его N-концевой части декапептид, и небольшое число синтетических аналогов, которые высоко гомологичны N-концевой последовательности ангиотензина.^{134, 150} Почти любая аминокислотная замена в субстрате в пентапептидном фрагменте до расщепляемой связи ($P_5 - P_1$) и на тетрапептидном участке после нее ($P'_1 - P'_4$) ведет к непродуктивному комплексу Михаэлиса и отсутствию гидролиза. Причина такой феноменальной специфичности ренина пока остается невыясненной.

2. Структура ренина и его ингибиторных комплексов

Ренин — гликозилированный белок — входит в ферментную систему, осуществляющую биогенез и распад октапептидного тканевого гормона ангиотензина II, самого мощного из известных прессорных агентов в системе кровообращения. Ангиотензин II стимулирует сужение периферических артериол по всему организму и тем самым повышает артериальное давление. Помимо этого, он активирует секрецию ряда гормонов (главным образом, альдостерона), влияет на работу сердца, печени, центрального и периферического отделов нервной системы и др. Его непосредственный предшественник ангиотензин I образуется из уже упоминавшегося глобулярного белка крови ангиотензиногена путем отщепления от него под действием ренина N-концевого декапептида. Согласно приведенной ниже схеме, гидролиз пептидной связи между остатками Leu-10 и Leu-11 является первой и скорость-определяющей стадией в каскаде ферментативных реакций превращения ангиотензиногена в ангиотензин II с его последующим разрушением.



АНГИОТЕНЗИН III

Пространственное строение ренина исследовалось в ряде работ.^{105–109} Идентифицирована трехмерная структура частично дегликозилированного нативного рекомбинантного ренина человека с разрешением 2.5 Å. Часть пептидных участков на периферии глобулы не просматривалась на картах электронной плотности, и поэтому они были отнесены к конформационно лабильным, лишенным детерминированных структур петлям. Позднее был выполнен¹⁰⁶ рентгеноструктурный анализ гликозилированного нативного ренина человека и его ингибиторных комплексов с разрешением 2.8 и 2.4 Å соответственно. Структура фермент-ингибиторного комплекса этого белка была определена также в работе¹⁰⁹ с разрешением 2.6 Å. В отмеченных работах описаны стабилизирующие взаимодействия специфических карманов активного центра фермента с боковыми цепями остатков $P_4 - P'_4$ на октапептидном участке ингибиторов.

Наиболее детально и с лучшим разрешением (2.0 Å) изучена¹⁵¹ кристаллическая структура субмаксиллярного ренина мыши, ингибированного субстратоподобным декапептидом СН-66.



где Piv — пивалоильная блокирующая группа, а CH(OH)CH_2 — гидроксиэтиленовая группа с S-конфигурацией второго асимметрического атома углерода Leu(ψ). Были определены положения 10 038 атомов 325 аминокислотных остатков гликозилированного фермента, 364 атомов ингибитора и 613 атомов кислорода кристаллизационной воды. Среднеквадратичная ошибка в координации атомов составила 0.21 Å, а среднеквадратичные отклонения от стандартных значений длин связей — 0.026 Å и угловых расстояний — 0.054 Å.

Трехмерные структуры исследованных ренинов имеют те же характерные особенности, что и другие аспартатные протеазы. Они также являются структурными белками, состоящими из двух доменов. Между ними находится субстратсвязывающая щель, в центре которой размещены каталитически важные остатки Asp-32 и Asp-215, а за ними, как и у других ферментов этой группы, следуют Thr и Gly. Очень близки пространственные структуры молекул ренина из разных источников. Например, различие в ориентациях доменов в структурах ренина мыши и человека не превышает 1.7°. Положение доменов у пепсина по сравнению с ренином мыши отличается на 6.9°, а у эндотиопепсина — 18.8°.

Декапептидный лиганд в фермент-ингибиторном комплексе имеет конформацию β -сложенного листа, вытянутого вдоль субстратсвязывающей щели (табл. 3).^{128–131, 151} Его карбоксиэтиленовая группа между двумя остатками Leu занимает в активном центре фермента чувствительное место субстрата и образует водородные связи с карбоксильными группами каталитических остатков Asp-32 и Asp-215. Конформационные состояния основных и боковых цепей всех остатков ингибитора в комплексе с ренином отвечают наиболее низкоэнергетическим формам свободных аминокислот, и в то же время, являясь развернутыми структурами, предоставляют наилучшие условия для эффективных взаимодействий с остатками активного центра фермента. В табл. 3 приведены значения двугранных углов ϕ , ψ и ω , определяющих геометрию основной цепи ингибитора ренина (СН-66)¹⁵¹ и трех ингибиторов аспартатной протеазы HIV-1 (U-85548e, JG-365, MVT-101).^{129–131} Из сопоставления данных табл. 3 следует, что совершенно разные ингибиторы

Таблица 3. Двугранные углы вращения ϕ , ψ , ω (град) основной цепи ингибитора СН-66 в активном центре ренина и ингибиторов U-85548t, JG-365 и MVT-101 в активном центре протеазы HIV-1 (см.^{108, 129–131})

Обозначение остатка	Ренин				Протеаза HIV-1											
	остаток	CH-66			остаток	U-85548e			остаток	JG-365			остаток	MVT-101		
		ϕ	ψ	ω		ϕ	ψ	ω		ϕ	ψ	ω		ϕ	ψ	ω
P ₅	His	–76	114	–170	Val	–	11	175	–	–	–	–	–	–	–	–
P ₄	Pro	–81	147	–175	Ser	–106	126	178	Ser	–64	169	180	–	–	–	–
P ₃	Phe	–103	123	180	Gln	–108	148	–177	Leu	–123	138	178	Thr	–	125	–176
P ₂	His	–111	92	–178	Asn	–138	101	–178	Asn	–143	104	180	Ile	–121	92	–178
P ₁	Leu(ψ)	–101	44 ^a	167 ^a	Leu(ψ)	–97	63 ^a	133 ^a	Phe(ψ)	–94	47 ^a	151 ^a	Nle(ψ)	–92	72 ^a	142 ^a
P' ₁	Leu	–89 ^a	130	177	Val	–56 ^a	150	173	Pro	–57 ^a	174	175	Nle	–92 ^a	154	–179
P' ₂	Tyr	–75	133	174	Ile	–139	124	177	Ile	–130	122	–177	Gln	–151	123	178
P' ₃	Tyr	–130	145	–174	Val	–126	157	–	Val	–143	138	–	Arg	–81	129	–
P' ₄	Ser	–85	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–

^a Значения углов отвечают нестандартным участкам P₁ – P'₁ ингибиторной цепи.

при ассоциации с активными центрами аспартатных протеаз млекопитающих и ретровируса принимают близкие конформационные состояния. Во всяком случае различия в значениях двугранных углов ингибитора ренина и протеазы HIV-1 не больше, чем различия углов ингибиторов одного фермента. Этот факт, как и данные табл. 2, свидетельствует о близких структурных состояниях субстратсвязывающих центров аспартатных протеаз, независимо от их источника.

Рентгеноструктурный анализ ингибиторного комплекса ренина мыши с декапептидом¹⁵¹ позволил идентифицировать аминокислотные остатки фермента, формирующие специфические карманы, и сделать некоторые количественные оценки их взаимодействий с боковыми цепями остатков ингибитора. Учитывая близость последнего к N-концевой последовательности ангиотензиногена, полученные здесь данные представляют несомненный интерес для последую-

щего теоретического изучения невалентных взаимодействий ренина с истинным субстратом и решения задачи о природе его исключительной специфичности.

В табл. 4 представлены 34 остатка ренина, образующие десять субстратсвязывающих карманов (S₆ – S'₄), межатомные контактные расстояния которых с ингибитором в комплексе не превышают 4.2 Å. Приведенные в табл. 4 остатки находятся на поверхности глобулы водорастворимого белка и, тем не менее, все они (за естественным исключением каталитически важных Asp-32 и Asp-215), как и взаимодействующие с ними остатки субстрата, являются гидрофобными, так что стабилизация комплекса осуществляется главным образом за счет дисперсионных сил.

О высокой комплементарности потенциальных поверхностей активного центра ренина и декапептидного ингибитора (субстрата), а следовательно, их предрасположенности к эффективным невалентным взаимодействиям можно судить по многочисленности межатомных контактов фермента с лигандом. Количественно это подтверждают данные, представленные в табл. 5. Они показывают резкое сокращение при сорбции ингибитора доступной растворителю поверхности аминокислотных остатков, образующих локусы S₆ – S'₄. Около половины остатков, в том числе Asp-32, Asp-215 и некоторые остатки флепа, оказываются полностью экранированными лигандом от контактов с внешней средой. Доступная растворителю общая площадь активного центра ~460 Å² уменьшается в комплексе до ~220 Å².

В табл. 6 сопоставлены поверхностно-доступные площади боковых цепей остатков P₅ – P'₄ ингибитора СН-66 в двух комплексах — с ренином и с эндотиапепсином. Согласно расчету,¹⁵¹ в первом случае такая площадь равна ~64, а во втором — ~130 Å². Данные этой таблицы свидетельствуют о значительно большей плотности упаковки одного и того же ингибитора в активном центре ренина по сравнению с эндотиапепсином. Особенно высокая комплементарность в рениновом комплексе имеет место в средней части декапептидного лиганда, т.е. в области расщепляемой пептидной связи.

Попытаемся ответить на вопрос, что нового принес рентгеноструктурный анализ в изучение аспартатных протеаз и в какой мере знание трехмерных структур этих ферментов и их ингибиторных комплексов сможет углубить наше понимание механизма каталитической реакции аспартатных протеаз. Ответ на этот вопрос имеет общее для

Таблица 4. Аминокислотные остатки ренина, атомы которых образуют близкие контакты с остатками P₆ – P'₄ ингибитора СН-66 (< 4.2 Å)¹⁵¹

Обозначение кармана	Остатки ренина, образующие субстратсвязывающие карманы
S ₆	Leu-10, Ser-12, Phe-220, Leu-276, W7, W8, W138
S ₅	Ser-12, Pro-111, Leu-114, Ser-219, W7, W8
S ₄	Ser-219, Phe-220, His-287, W77, W138, W147
S ₃	Gln-13, Ser-77, Pro-111, Leu-114, Ala-115, Phe-117, Gly-217, Ser-218, Ser-219, W7, W11, W77
S ₂	Tyr-75, Gly-76, Ser-77, Ser-218, Ser-222, His-287, Met-289, Val-300, W77, W147
S ₁	Asp-32, Gly-34, Tyr-75, Phe-117, Val-120, Asp-215, Gly-217
S' ₁	Gly-34, Ile-73, His-74, Tyr-75, Gly-76, Glu-128, Val-130, Val-213, Asp-215, Ile-291, Val-298, Val-300, W76, W87
S' ₂	Gly-34, Ser-35, Ile-73, His-74, Tyr-75, Glu-128, Val-130, Ile-291, Thr-295, W28, W73, W74, W76
S' ₃	His-74, Tyr-75, Gly-76, Ile-291, Pro-292, Thr-295, W74, W75
S' ₄	Pro-294, Thr-295, W75

Таблица 5. Изменение доступной растворителю контактной площади остатков активного центра ренина при ингибировании СН-66 (см.¹⁵¹)

Остаток	Площадь, Å ²			Остаток	Площадь, Å ²		
	свободный ренин	комплекс СН-66	поверхность, доступная растворителю		свободный ренин	комплекс СН-66	поверхность, доступная растворителю
Leu-10	37.3	30.1	7.2	Gln-128	14.0	5.5	8.5
Ser-12	7.1	0.2	6.9	Val-130	14.2	9.9	4.3
Gln-13	7.3	1.0	6.3	Val-213	5.1	0.8	4.3
Ile-30	4.8	1.8	3.0	Asp-215	4.8	0.0	4.8
Asp-32	3.2	0.0	3.2	Ser-218	5.7	0.0	5.7
Ser-35	2.7	0.0	2.7	Ser-219	10.2	0.4	9.8
Ile-73	3.3	0.1	3.2	Phe-220	12.4	2.5	9.9
His-74	33.1	19.2	13.9	Leu-276	12.7	7.1	5.6
Tyr-75	11.7	0.0	11.7	Thr-283	9.3	5.7	3.6
Gly-76	4.2	0.3	3.9	His-287	16.0	4.8	10.2
Ser-77	15.2	4.2	11.0	Met-289	18.5	14.3	4.2
Ile-110	36.1	32.2	3.9	Ile-291	10.3	0.5	9.8
Pro-111	13.1	1.2	11.9	Pro-292	30.0	19.0	11.0
Phe-112	3.6	0.6	3.0	Pro-294	37.6	29.5	8.1
Leu-114	34.9	21.5	13.4	Thr-295	25.4	10.0	15.4
Phe-117	7.2	0.1	7.1	Val-300	5.6	0.2	5.4
Val-120	3.6	0.0	3.6				

энзимологии значение, поскольку, как отмечалось, протеазы являются наиболее изученными во всех отношениях объектами биокатализа. Рассмотрим гипотетические модели механизма действия аспартатных протеаз, в основу разработки которых были положены данные о трехмерных структурах ферментов и их комплексов с субстратоподобными ингибиторами.

Таблица 6. Сравнение поверхностно-доступных площадей боковых цепей остатков P₅–P₄ ингибитора СН-66 в комплексах с ренином и эндотиапепсином

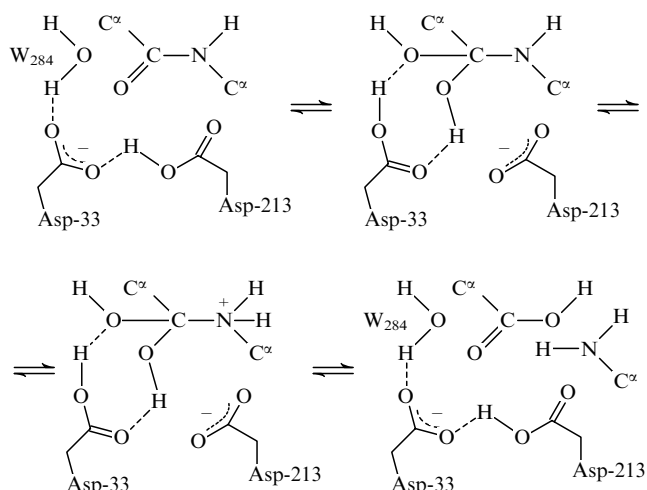
Обозначение остатка	Остаток	Доступная растворителю поверхность комплекса, Å ²	
		ренин	эндотиапепсин
P ₅	His	20.6	35.7
P ₄	Pro	7.7	11.3
P ₃	Phe	0.4	6.9
P ₂	His	0.5	8.7
P ₁	Leu(ψ)	0.0	0.5
P ₁ '	Leu	0.6	0.9
P ₂ '	Tyr	7.8	7.2
P ₃ '	Tyr	12.4	38.0
P ₄ '	Ser	13.9	20.2

3. Механизм каталитической реакции аспартатных протеаз

Первую стереохимическую модель предложили в 1985 г. Джеймс и Силецки,¹¹² использовав для этого кристаллическую структуру пенициллопепсина, расшифрованную с разрешением 1.8 Å.^{111,112} О механизме действия аспартатных протеаз ранее был высказан ряд соображений, опирающихся на знание трехмерных структур ферментов.^{111,123,152–158} Однако все они в той или иной мере имели незавершенный характер и не претендовали на последовательное описание всего процесса гидролиза пептидной связи, катализируемого аспартатными протеазами. В стереохимической модели продуктивного ковалентного комплекса Михаэлиса, построенного Джеймсом и Силецки, важная роль принадлежит молекуле кристаллизационной воды W₂₈₄. В активном центре пенициллопепсина она занимает место, одновременно удобное и для образования с боковой цепью Asp-33 эффективной водородной связи, что повышает ее нуклеофильность, и для атаки на атом карбонильного углерода гидролизуемой связи, что ведет к ослаблению последней. В этом же направлении действует протонированная карбоксильная группа остатка Asp-213, поляризующая посредством водородной связи карбоксильную группу субстрата и выступающая, таким образом, в качестве электрофильного компонента системы (схема 1).

Отмеченные три взаимодействия инициируют разрушение делокализованной π–n-электронной системы расщепляемой пептидной связи, пирамидализацию атомов азота и карбонильного углерода, появление при последнем гем-гидроксильных групп, вовлеченных в водородное связывание протонированной карбоксильной группой Asp-33. Возвращение неподеленной пары электронов к атому азота

Схема 1



усиливает его склонность к протонированию, которое, по мнению авторов¹¹², может осуществляться двумя равновероятными способами. В одном из них предполагается инверсия конфигурации связей атома N, происходящая путем поворота аминной группы субстрата на $\sim 60^\circ$ вокруг связи C—N. В результате неподеленная пара оказывается ориентированной в сторону растворителя, и азот легко поддается протонированию, особенно у аспартатных протеаз с сильно кислым pH. Альтернативный способ включает переход протона к атому N от одной из гидроксильных групп тетраэдрического аддукта, находящегося в *син*-конфигурации по отношению к неподеленной электронной паре атома азота. Образовавшееся соединение неустойчиво и распадается на две части, одна из которых включает amino-, а другая — карбоксильную группу.

Исходное предположение авторов работы¹¹² состоящее в том, что нуклеофилом в каталитической реакции аспартатных протеаз является молекула W_{284} , оспаривается Сугуной и соавт.,¹²⁴ которые имеют иное видение механизма действия ферментов. Сконструированная ими стереохимическая модель основана на кристаллографических данных о трехмерных структурах нативного ризопусепсина¹²² и его комплекса с октапептидным ингибитором с восстановленной пептидной связью, расщепляемой при взаимодействии с субстратом. В качестве нуклеофила авторы работы¹²⁴ выбрали молекулу воды W_{507} (W_{39} в нумерации пеницилло-

пепсина), локализованную между двумя карбоксильными группами остатков Asp-35 и Asp-218 и образующую с ними три водородные связи (схема 2). Предполагается, что молекула W_{507} не подвергается вытеснению субстратом, поскольку при его сорбции гидролизуемая пептидная связь, испытывая стерические затруднения, принимает неплоскую, энергетически невыгодную конфигурацию. В этом положении субстрата карбонильный углерод расщепляемой связи оказывается против атакующего атома кислорода W_{507} , а кислород карбонильной группы располагается на оптимальном для водородной связи расстоянии от гидроксила боковой цепи Asp-35. В результате образования тетраэдрического аддукта группа OH молекулы воды переходит к субстрату, а атомы H сначала к карбоксилу Asp-218, а затем к азоту. Реорганизация промежуточного соединения ведет к разрыву пептидной связи субстрата, десорбции продуктов реакции и восстановлению активного центра.

В схеме каталитической реакции аспартатных протеаз, предложенной Пирлом,¹⁵⁹ нуклеофилом, как и в только что рассмотренной схеме 2, является молекула воды W_{507} (схема 3). Новое в этом модельном описании состоит в предположении равенства констант кислотности и, следовательно, электронной эквивалентности карбоксильных групп остатков Asp-35 и Asp-218, имеющих обобщенный протон, и, кроме того, во введении в качестве электрофильного компонента, дополнительно поляризующего карбонильный кислород расщепляемой связи, двух групп NH остатков Gly-78 и Asp-79 (нумерация ризопусепсина), которые входят в последовательность нависающего над субстратом флепа. Действия нуклеофила и электрофила в согласии с предыдущими моделями механизма функционирования аспартатных протеаз приводят к образованию неустойчивого промежуточного соединения, распадающегося с N- и C-концов. И в этом случае, как и в рассмотренных выше, автор следует концепции напряжения и принудительной деформации, т.е. постулирует возможность трансформации энергии фермент-субстратных невалентных взаимодействий в энергию искажения пептидной связи, приближающего ее к переходному состоянию и тем самым облегчающего гидролиз.

Схема 3

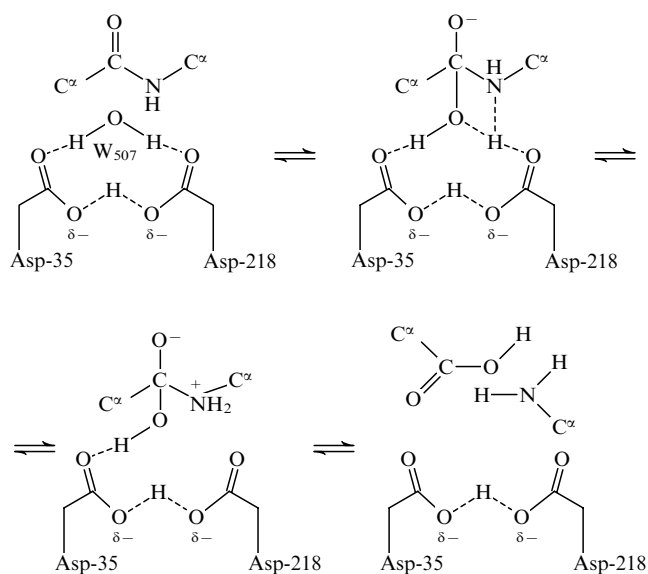
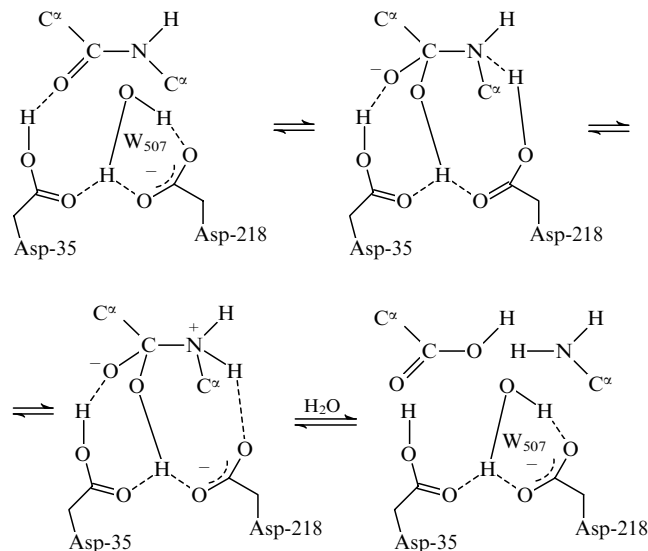
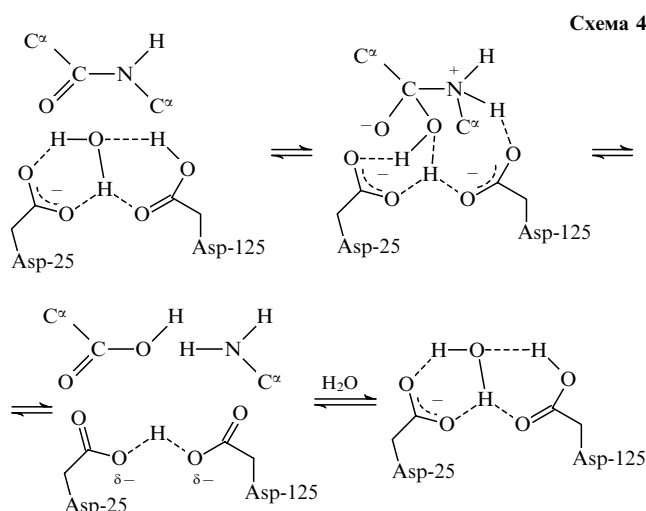


Схема 2



Модель механизма действия аспартатных протеаз, предложенная Яскольски и соавт.,¹²⁹ основана на трехмерной структуре ретровируса протеазы HIV-1. В качестве нуклеофила и здесь выбирается молекула W_{507} (нумерация пенициллопепсина), расположенная на равных расстояниях между боковыми цепями остатков Asp-25 и Asp-125 (схема 4). Учитывая симметрию фермента, авторы поместили одну из



гидроксильных групп H_2O вдоль оси второго порядка таким образом, что она может образовывать вилочную водородную связь с внутренними карбоксильными атомами кислорода остатков аспарагиновой кислоты. Вторая гидроксильная группа H_2O направлена к внешнему кислороду карбоксилата Asp-25. Кислый протон неионизованной боковой цепи Asp-125 образует водородную связь с атомом кислорода молекулы кристаллизационной воды W_{507} . Таким образом, согласно динамической модели,¹²⁹ нативная протеаза HIV-1 в равновесном состоянии обладает симметричной системой из пяти атомов кислорода, в поле которых соответствующим образом мигрируют атомы водорода. Симметрия активного центра нарушается при взаимодействии фермента с субстратом. В результате нуклеофильной атаки одновременно разрушается карбонильная группа расщепляемой связи, изменяется гибридизация атомов углерода и азота ($sp^2 \rightarrow sp^3$), возникает валентная связь $\text{C}-\text{OH}$ и происходит протонирование азота. Иными словами, фермент-субстратный комплекс проходит в одну стадию неустойчивое промежуточное состояние, которое завершается образованием продуктов реакции и возвращением фермента в исходное положение.

Несмотря на существенные различия предложенных моделей, они едины в своих исходных положениях.

Во-первых, предполагается, что аспартатные протеазы функционируют по принципу общего катализа и, следовательно, по ходу реакции не образуют с субстратом ковалентных промежуточных комплексов.

Во-вторых, утверждается, что для реализации каталитического действия протеаз необходимо наличие в системе нуклеофила, основного и кислотного катализаторов (расхождение — в их выборе).

В-третьих, во всех гипотезах предполагается, что ферментативная реакция гидролиза пептидной связи проходит стадию неустойчивого промежуточного соединения (тетраэдрического аддукта).

В-четвертых, во всех предложенных стереохимических моделях общей является трактовка побудительных мотивов функционирования аспартатных протеаз, основывающаяся на концепции деформации и напряжения.¹⁶⁰

Эти положения были сформулированы и подтверждены экспериментально при изучении ферментативных и модельных неферментативных реакций еще до того, как был выполнен рентгеноструктурный анализ хотя бы одной молекулы аспартатной протеазы. Установление трехмерных структур ферментов и их комплексов с субстратоподобными ингибиторами дополнительно подтвердило некоторые из ранее сделанных заключений и позволило визуализировать уже сложившиеся представления.

Таким образом, разработанные схемы ферментативного катализа интересны в том отношении, что они исходят, по существу, из одного и того же экспериментального материала, включающего данные рентгеноструктурного анализа, полученные в последние годы, и базируются на одних и тех же теоретических представлениях о природе биокатализа, сложившихся до становления кристаллографии белков и давно ставших традиционными. На несовершенство сделанных обобщений указывает то обстоятельство, что при единстве исходного опытного материала и теоретической основы, а также в рамках единого подхода была предложена не одна стереохимическая модель функционирования аспартатных протеаз, а четыре различные модели, которых, впрочем, могло бы быть и больше. Они не образуют ряда, свидетельствующего о количественном развитии знаний о механизме действия ферментов, а скорее, представляют собой различные точки зрения. Рассмотренные гипотезы отвечают одному уровню понимания изучаемого явления, и равноценны как в своей аргументации, так и предсказательной силе. Что же привнесла нового в изучение каталитических реакций аспартатных протеаз и других ферментов рентгеновская кристаллография белков?

Прежде всего следует отметить, что данные рентгеноструктурного анализа позволили определить не только область активного центра фермента, но и его геометрию на уровне координат атомов. Сделать это с такой же полнотой и степенью надежности другим способом в настоящее время не представляется возможным. Далее, использование этого метода для расшифровки трехмерных структур нативного фермента и его комплексов с различными ингибиторами позволило выявить конформационные перестройки активного центра, которые могут иметь место на разных стадиях каталитического акта. Эти данные так же уникальны и информативны.

Велика роль рентгеноструктурного анализа в исследовании специфичности фермент-субстратных взаимодействий и локализации областей связывания активного центра с чувствительными местами субстрата и примыкающими к нему с обеих сторон остатками. Что же касается взаимной ориентации расщепляемой связи относительно каталитически активных остатков фермента, отвечающих продуктивному связыванию истинного субстрата, то вопрос остается нерешенным. Высказанные мнения, как это видно на примере предложенных четырех различных стереохимических моделей функционирования аспартатных протеаз, могут подразделяться на более или менее правдоподобные, однако и те и другие, несмотря на знание конформаций фермента в нативном состоянии и в комплексе с ингибитором, имеют лишь гипотетический характер.

Рассмотренный материал об аспартатных протеазах, как и подобный материал о химотрипсине, трипсине, карбокси-пептидазе и лизоциме, изложенный ранее,¹⁶¹ дает основание заключить, что появление уникальной количественной информации о пространственном строении ферментов и их комплексов не привело к концептуальному развитию энзимологии и переосмыслению сложившихся представлений о природе биокатализа.

С появлением рентгеноструктурного анализа ферментов не произошел переход от умозрительных представлений о ферментативном катализе к строгому количественному описанию этого явления. Не изменилась также направленность биокаталитических исследований, по-прежнему следующих от функции к структуре, что неслучайно, поскольку результатом рентгеноструктурного исследования может быть лишь знание морфологии биосистем атомно-молекулярного уровня, которая сама по себе не является конечной целью изучения ферментов. Морфология объекта — это всегда нечто предварительное и совершенно необходимое для последующего изучения структурной и структурно-функциональной организации биосистем. Поэтому ставшее извест-

ным с помощью рентгеноструктурного анализа пространственное строение многих сотен молекул ферментов не решило проблему биокатализа, но сделало реальным разработку подхода к изучению ферментативного катализа в направлении от структуры к функции и априорного количественного описания механизма каталитической реакции. Благодаря развитию кристаллографии белков, проблема создания общей теории биокатализа и соответствующих методов расчета впервые обрела форму подлинно научной проблемы, решаемой на уровне современных естественно-научных знаний.

V. ДНК-Связывающие белки

В этом разделе изложены некоторые кристаллографические исследования белков последних лет. Рассматриваемые ниже работы демонстрируют новейшие достижения кристаллографии, позволившие расшифровывать на атомном уровне трехмерные структуры белков и комплексов, состоящих из тысячи и более аминокислотных остатков. Техническое развитие метода проявилось в наметившемся в начале 90-х годов переходе от рентгеноструктурных исследований отдельных белковых молекул к не менее детальному изучению пространственных структур макромолекулярных белковых олигомеров, их агрегатов с другими соединениями и субклеточными системами. Иными словами, на атомном уровне стали осваиваться структуры более сложных биологических систем.

Для рассмотрения выбраны такие объекты, которые были интересны в отношении своей структурно-функциональной организации и в то же время наглядно иллюстрировали сегодняшние достижения кристаллографии белков. К ним, безусловно, относятся ДНК-связывающие белки, принимающие прямое участие как в создании генетического аппарата, так и на всех стадиях его функционирования. В эукариотических клетках такие белки традиционно подразделяются на две группы: гистоновые белки, участвующие в создании определенной структуры ДНК внутри клеточного ядра, и негистоновые белки, обеспечивающие биосинтез РНК. Ниже рассматриваются результаты рентгеноструктурного анализа гистонов и β -галактозидазы, представителей обеих групп ДНК-связывающих белков.

1. Структура гистонового кора нуклеосомы

Гистоны — это пять разновидностей небольших структурных белков H1, H2A, H2B, H3 и H4, аминокислотные последовательности которых содержат соответственно 220, 128, 124, 134 и 102 остатка. Они обеспечивают плотную упаковку двойной спирали ДНК, которая в растянутом состоянии имеет очень большую длину. Например, в каждой хромосоме человека она составляет в среднем ~ 5 см. Поэтому гистоны прежде всего необходимы для упорядоченного расположения длинной двухцепочечной полинуклеиновой кислоты в небольшом объеме клеточного ядра. Однако не только для этого: характер упаковки ДНК влияет на активность соответствующих участков генома. Следовательно, его гистоновая структурная организация является одним из способов регуляции и контроля транскрипции РНК с ДНК. Аминокислотные последовательности гистонов содержат около четверти положительно заряженных остатков Lys и Arg, что позволяет им эффективно связываться с двойной спиралью ДНК, независимо от ее нуклеотидного состава.

Гистоны, особенно H2A, H2B, H3 и H4, относятся к самым консервативным из известных белков. В табл. 7 сопоставлены скорости изменений аминокислотных последовательностей ряда белков и гистона H4 на протяжении эволюционного времени. Приведенные цифры позволяют считать, что в гемоглобине вредными оказываются примерно четыре из каждых пяти случайных аминокислотных

Таблица 7. Изменения аминокислотных последовательностей белков на протяжении эволюционного времени ¹⁶²

Белок	Единица эволюционного времени, ^a млн. лет
Фибринопептид	1.2
Гемоглобин	6.1
Цитохром- <i>c</i>	21.0
Гистон H4	600.0

^a Единица эволюционного времени — среднее время, необходимое для того, чтобы в данном белке на каждые 100 аминокислотных остатков могла появиться одна приемлемая замена.

замен, в цитохроме *c* — 17 из каждых 18, в гистоне же H4 не вредных замен практически нет. Поскольку все пары оснований ДНК подвержены случайным мутациям в равной мере, то эволюционная стабильность гистонов предполагает их чрезвычайно ответственную роль в организации и функционировании генетического аппарата.

Гистоны составляют около половины массы хромосомы, где они участвуют в организации нескольких уровней упаковки двойной спирали ДНК. Вместе с другими белками гистоны образуют с ДНК комплексы, названные хроматином. Впервые Корнберг в 1974 г. выделил повторяющуюся структурную единицу хроматина ¹⁶³ и позднее установил, ¹⁶⁴ что она состоит из белковой сердцевины октамерного кора, содержащего по две молекулы каждого из гистонов H2A, H2B, H3 и H4, и фрагмента двойной спирали ДНК. Было высказано предположение, ¹⁶⁵ что двухцепочечная ДНК закручена вокруг гистонового кора и образует два витка суперспирали из 165 пар оснований. Позднее эта цифра была исправлена на 146 (см. ¹⁶⁶). Обнаруженная структурная единица хроматина получила название нуклеосомы. ¹⁶⁷ Исследования гистонового кора с помощью различных физико-химических методов показали, что октамер представляет собой гетерогенный белковый ансамбль (H2A–H2B–H3–H4)₂, состоящий из трех структурных субъединиц: тетрамера (H3–H4)₂ и двух димеров (H2A–H2B). Двойная спираль ДНК в хроматине тянется как непрерывная нить от одной нуклеосомы к другой. Расположенные между нуклеосомами линейные линкерные участки ДНК имеют разную длину, которая обычно невелика и в среднем составляет 60 нуклеотидов. Нуклеосомная нить определяет более высокие уровни компактизации хроматина. В конечном счете, он предстает в электронном микроскопе в виде так называемой 30-нанометровой хроматиновой фибриллы.

За укладку нуклеосомной нити в составе хроматиновой фибриллы отвечает гистон H1. Центральная часть его молекулы представляет собой глобулу, которая взаимодействует со специфическим участком нуклеосомы. N- и C-Концевые фрагменты белка имеют вытянутые формы. N-концевой фрагмент ассоциирован с предшествующей линкерной ДНК в области ее контакта с нуклеосомной частицей, а C-концевой фрагмент — с гистоновым кором последующей нуклеосомы. Кроме того, замечено, ¹⁶⁸ что свободная молекула H1 легче взаимодействует с ДНК в непосредственной близости от другой, уже присоединившейся молекулы гистона, чем отдельно от нее. Этим обусловлена склонность белков H1 связываться с ДНК группами по восемь и более молекул. Предполагается, что взаимодействие такого типа, названное кооперативным связыванием, лежит в основе активации генов. Вызванная им конденсация молекул гистона H1 превращает некоторые хроматиновые участки в своеобразные микрокристаллы, «плавление» которых под действием внешнего регуляторного сигнала ведет к разрушению гистонового кластера и локальной перестройке хроматина. ^{162,169}

Выяснение внутренней структурной организации гистонового кора и его взаимодействий с двойной спиралью ДНК началось, как уже отмечалось, в 1974 г.¹⁶³ Вскоре структура октамера была изучена в растворе методами малоуглового рассеяния нейтронов и рентгеновских лучей с разрешением ~ 20 Å (см.^{170–172}) и в кристаллическом состоянии — с помощью рентгеноструктурного анализа в работах^{166, 173, 174} (разрешение 22 Å (см.¹⁷⁵), 7.0 Å (см.^{176, 177}) и 3.5 Å). Согласно кристаллографическим данным,¹⁷⁷ чистый гистоновый кор эритроцита цыпленка — октамер, имеющий форму эллипсоида с осями 110 и 65–70 Å. Предложенная авторами этой работы модель состояла из трех частей: центрального тетрамера (Н3–Н4)₂ и расположенных на его противоположных сторонах двух димеров (Н2А–Н2В). Однако как форма, так и размеры октамера существенно отличались от параметров, полученных в ряде других исследований.^{166, 173–175} Повторный рентгеноструктурный анализ^{178, 179} установил внешние размеры гистонового кора, которые совпали с данными других работ (высота ~ 55 Å, диаметр ~ 70 Å).

Некоторым авторам трехмерная структура гистонового кора напоминает плоский диск, другим — шпильку или катушку, третьим — клин, поэтому ясно лишь одно: структура октамера достаточно сложна и не имеет прямых аналогов. Более детальное обсуждение геометрии комплекса (Н2А–Н2В–Н3–Н4)₂ может опираться только на результаты последующих исследований,^{178, 179} так как они получены с разрешением 3.1 Å, уже позволяющим идентифицировать конформационные состояния аминокислотных остатков и даже отдельных боковых цепей.

Ранее, при рентгеноструктурном анализе целой нуклеосомы^{166, 170, 173} было показано, что правая двойная спираль ДНК закручена вокруг гистонового кора в виде левой суперспирали с внутренним диаметром ~ 70 и длиной ~ 55 Å. Это нашло подтверждение в исследовании структуры изолированного октамера,^{178, 179} на поверхности которого была обнаружена бороздка белковой суперспирали. Она имеет внешний диаметр ~ 65 , шаг ~ 28 Å и левую закрутку, что полностью отвечает параметрам суперспирали ДНК в нуклеосоме. Таким образом, поверхности гистонового кора и закручиваемой вокруг него двойной спирали ДНК соотносятся между собой так же, как поверхности винта и гайки. Между тем образование нуклеосомы вряд ли представляет собой ввинчивание белкового октамера в строго детерминированную нуклеотидную структуру. Этому препятствуют, во-первых, наличие на спиральной бороздке нуклеосомного сердечника чередующихся возвышений и впадин и, во-вторых, то обстоятельство, что суперспираль молекулы ДНК в свободном состоянии не является стабильной формой, хотя, по-видимому, и относится к низкоэнергетическим конформациям. Более вероятно, что образование нуклеосомы происходит путем накручивания лабильной двойной спирали ДНК на гистоновый кор, подобно наматыванию нитки на катушку. Таков же механизм и противоположного процесса освобождения двухцепочечной ДНК от белкового комплекса. В пользу этой модели свидетельствует комплементарность возвышений и впадин внутренней центральной части нуклеосомы профилю контактной поверхности суперспирали ДНК, образованной В-формой ее двойной спирали.

В связи с установлением трехмерной структуры гистонового октамера (Н2А–Н2В–Н3–Н4)₂ и его стерических взаимоотношений с ДНК встает целый ряд вопросов принципиального порядка. Например, каковы механизм и причины спонтанного возникновения белкового комплекса и самосборки нуклеосомы в целом? Не менее интересен и вопрос о том, каким образом происходит освобождение нуклеотидной цепи от гистонового кора? Дело в том, что доступность ДНК, входящей в состав нуклеосом, существенно ограничена на тех участках, где двойная спираль соприкасается с поверхностью октамера. Присоединение

специфических регуляторных белков к функционально активным нуклеотидным последовательностям становится возможным только при освобождении соответствующих участков связывания ДНК от нуклеосом. Поэтому выяснение причины распада нуклеопротеиновых комплексов столь же важно, как и исследование причины их возникновения. Можно полагать, что после того, как механизм создания и разрушения нуклеосом получит количественную трактовку, будет решен и один из наиболее интригующих вопросов, касающихся гистоновых белков, а именно, почему гистоны Н2А, Н2В, Н3 и Н4 в отношении своих аминокислотных последовательностей являются самыми консервативными в природе белками (см. табл. 7). Не исключено, что нуклеосома представляет собой уникальную по своей структурной организации клеточную субъединицу. Из общих соображений можно полагать, что в ней должны сочетаться идеальная согласованность внутри- и межмолекулярных взаимодействий белков, образующих гистоновый октамер, комплементарность поверхности нуклеосомного кора контактной поверхности суперспирали ДНК и в то же время наличие тонкого баланса сил противоположной направленности, нарушение которого при соответствующих изменениях внешних условий ведет к быстрому смещению равновесия в сторону возникновения или распада нуклеопротеинового комплекса. Консервативность гистонов Н2А, Н2В, Н3 и Н4 указывает на то, что нормальное функционирование такой системы практически исключает аминокислотные замены.

2. Структура N-концевого фрагмента ДНК-топоизомеразы I

При репликации ДНК скорость полимеризации у бактерий и млекопитающих колеблется соответственно от 500 до 50 нуклеотидов в секунду. При этом на каждые 10 пар оснований синтезированной вновь цепи родительская двойная спираль ДНК, чтобы не быть запутанной, должна совершать один полный оборот вокруг своей оси (рис. 14). Следовательно, для беспрепятственного передвижения репликационной вилки с наблюдаемой на опыте скоростью вся хромосома, находящаяся впереди вилки, должна совершать 50 ± 5 об $\cdot$ с⁻¹. Точно такая же «проблема кручения» возникает, очевидно, при транскрипции и рекомбинации ДНК. Во всех случаях она решается с помощью особых ферментов, ДНК-топоизомераз, образующих в спиральях своего рода «шарниры».

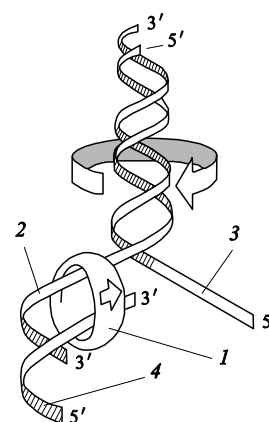


Рис. 14. Вращение двойной спирали ДНК при ее репликации; 1 — ДНК-полимераза на ведущей цепи, 2 — матрица для синтеза ведущей цепи, 3 — матрица для синтеза отставшей цепи, 4 — синтезированная вновь цепь ДНК

ДНК-Топоизомераза I расщепляет фосфодиэфирную связь в одной из цепей ДНК и ковалентно присоединяется, как правило, посредством боковой цепи тирозина, к образовавшемуся свободному 5'-концу. Обрыв цепи дает возможность двум половинам двойной спирали свободно вращаться вокруг фосфодиэфирной связи, находящейся напротив разрыва, и тем самым снимать накопившееся напряжение. Ковалентная связь белок–ДНК высокоэнергетична, а поэтому реакция ферментативного гидролиза фосфодиэфирной связи обратима и не требует участия АТФ. После снятия напряжения разорванные концы цепи ДНК соединяются вновь. Таким образом, по своей функции ДНК-топоизомераза представляет собой нечто вроде «обратимой нуклеазы» или «обратимой ДНК-полимеразы». Впервые ДНК-топоизомераза была выделена из клеток *E. coli* в 1971 г.¹⁸⁰ До сих пор она остается наиболее широко изученным ферментом подсемейства ДНК-топоиomerаз типа I, к которому принадлежат открытые много лет спустя топоизомеразы III бактерий *E. coli*¹⁸¹ и *Saccharomyces cerevisiae*,^{182, 183} а также обратимая гираза архебактерии *Sulfolobus acidocaldarius*.^{184, 185} Помимо описанной реакции, ферменты этого типа катализируют релаксацию неправильно закрученной линейной суперспирали ДНК, распутывание и замыкание колец единичной цепи ДНК, спаривание комплементарных колец и ряд других родственных операций. Общим для ДНК-топоиomerаз типа I является механизм каталитического акта, протекающего без использования энергии АТФ и непременно включающего стадию временного разрыва только одной цепи двойной спирали ДНК. Аналогичные по функции ферменты, расщепляющие, однако, не одну, а две фосфодиэфирные связи и ковалентно связывающиеся с обеими цепями двойной спирали, составляют подсемейство ДНК-топоиomerаз типа II.¹⁸⁶

В 1994 г. опубликованы результаты рентгеноструктурного анализа пространственного строения N-концевого фрагмента ДНК-топоиomerазы I *E. coli*.¹⁸⁷ Трехмерная структура фрагмента полипептидной цепи из 553 аминокислотных остатков, с молекулярной массой 67 кДа (целый белок 97 кДа) была определена с разрешением 2.2 Å при расшифровке дифракционных картин, полученных при температуре –168°C и использовании синхротронного излучения. Данная работа — это первое кристаллографическое исследование топоиomerазного объекта.

ДНК-Топоизомераза I — металлофермент, C-концевой фрагмент которого содержит три атома Zn(II) и три участка с двумя дисульфидными связями.¹⁸⁸ Каталитическая реакция расщепления нуклеотидной цепи ДНК включает трансэтерификацию между фосфодиэфирной связью субстрата и боковой цепью Tyr-319 фермента.¹⁸⁹ В этой реакции не участвует C-концевой фрагмент белка с дисульфидными связями. Что касается атомов цинка, то они также не оказывают влияния на стадию расщепления фосфодиэфирной связи, однако необходимы для замыкания разорванной цепи после релаксации ДНК.¹⁹⁰ Поэтому исследованный в работе¹⁸⁷ фрагмент ДНК-топоиomerазы I с молекулярной массой 67 кДа может катализировать расщепление единичной нуклеотидной цепи, но не в состоянии восстановить целостность суперспирали ДНК. Его субстратная специфичность и кинетические характеристики такие же, как у нативного белка или белка, лишенного цинка.^{190, 191}

Трехмерная структура N-концевого фрагмента представляет собой неправильный вытянутый тор с внешними размерами ~67 × 43 × 86 Å. Он образован отделенными друг от друга и хорошо наблюдаемыми четырьмя доменами I–IV. В домен III входит каталитически важный остаток Tyr-319 (рис. 15, схема 5).

Отверстие тора, свободное от боковых цепей остатков, имеет диаметр ~28 Å, так что вхождение в него двойной спирали ДНК в В-форме не должно сопровождаться стерическими затруднениями. Укладка эффективно взаимодей-

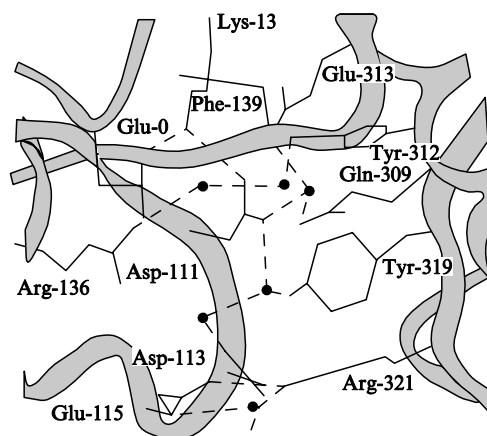


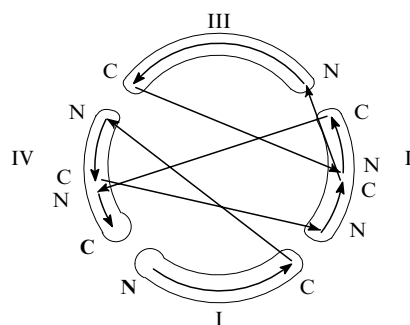
Рис. 15. Активный центр ДНК-топоиomerазы, образованный доменами I, II. Пунктиром отмечены водородные связи¹⁸⁷

ствующих между собой доменов I, III и IV привела к образованию большой субстрат-связывающей щели и еще одного отверстия в непосредственной близости от главного отверстия тора и активного центра с аминокислотным остатком Tyr-319. Второе отверстие имеет небольшой диаметр, однако вполне достаточный для прохождения единичной цепи ДНК.

Общепринятой стала точка зрения, что возникновение по ходу эволюции новых сложных белков происходит путем слияния предсуществовавших.^{192, 193} При этом трехмерная структура мультидоменного белка представляется ансамблем в значительной мере независимых глобулярных доменов, ранее существовавших как индивидуальные белки, а аминокислотная последовательность — набором полипептидных цепей доменов, в которых C-конец предшествующего соединен с N-концом последующего. Такому способу образования сложных белков никак не соответствует структурная организация ДНК-топоиomerазы, ход полипептидной цепи которой нельзя представить в виде последовательного и независимого образования доменов.

Сборка аминокислотной последовательности фрагмента 67 кДа, по-видимому, начинается с N-концевого домена I, состоящего из непрерывного полипептидного участка (схема 5). Затем, вместо того, чтобы сразу направиться к домену II, цепь следует к домену IV и только потом идет к II, завершив, однако, образование IV лишь на одну треть. Далее, поучаствовав и здесь в построении только одной половины домена II, цепь переходит к домену III. По завершению его организации она вновь возвращается сначала к домену II, а затем к IV, заканчивая их построение. При описанном ходе аминокислотной последовательности все взаимодействия домена III с доменами I и IV ограничены невалентными контактами. Ковалентно связанные между

Схема 5



собой домены II, III, полипептидная цепь которых не переплетается с цепью других доменов, могут перемещаться как твердое тело относительно остальной части белка. Такая структурная организация молекулы фермента с двумя формами тора (открытой и закрытой) имеет, по мнению авторов¹⁸⁷, решающее значение для реализации функции ДНК-топоизомеразы I, так как перемещение доменов II и III открывает доступ к активному центру как одноцепочечной, так и двухцепочечной ДНК.

Предположение о необходимости значительных конформационных изменений молекулы ДНК-топоизомеразы I в процессе образования невалентного комплекса Михаэлиса подтверждается и рядом других, не менее убедительных структурных особенностей фермента. Одна из них касается каталитически наиболее важного остатка Tug-319. Он принадлежит домену III и расположен рядом с субстрат-связывающей цепью. В нативном ферменте Tug-319 помещается в узкой расщелине между доменами I, III и экранирован от контактов с внешней средой белковой цепью Arg-321, образующей солевые мостики одновременно с боковыми цепями Asp-113 и Glu-115. Переход от закрытой формы молекулы к открытой не только делает возможным проникновение ДНК во внутреннюю часть тора, но и выводит остаток Tug-319 на поверхность, предоставляя ему условия для сближения с нуклеотидной цепью субстрата и атаки на фосфодиэфирную связь. Перемещение доменов II, III как единого целого стимулируется невалентными взаимодействиями белок – ДНК, поскольку такой кофактор, как АТФ, в данном случае отсутствует. Это обстоятельство отличает ДНК-топоизомеразы I от ДНК-топоизомеразы II, катализ которых также связан с конформационными изменениями, требующими, однако, участия АТФ.

В работе¹⁸⁷, посвященной трехмерной структуре N-концевого фрагмента ДНК-топоизомеразы I, авторы большое внимание уделяют описанию многих деталей механизма каталитического акта. Однако этот материал, как и в других подобных исследованиях, имеет феноменологический характер.¹⁹⁴ Значение данных рентгеноструктурного анализа ферментов, очевидно, не только в том, чтобы подстраивать под них существующие теоретические схемы катализа или придумывать новые. Эти данные ценны своей научной потенциальностью, возможностью использования в качестве уникальной экспериментальной основы априорного подхода к количественному описанию каталитического акта как спонтанно протекающего процесса.¹⁹⁵

3. Структура β -галактозидазы

Включить в раздел, посвященный ДНК-связывающим белкам, фермент, строго говоря, не принадлежащий к таковым, побудили следующие два обстоятельства: во-первых, структурная организация молекулы β -галактозидазы, которую оказалось интересным сопоставить с только что рассмотренной организацией ДНК-топоизомеразы; во-вторых, участие фермента в регуляции транскрипционной активности ДНК, проявляющейся в его влиянии на эффективность считывания в процессе транскрипции целого кластера генов (включая собственный), ответственных за метаболизм лактозы. β -Галактозидаза сыграла историческую роль в развитии молекулярной биологии, конкретно — в представлении об общих молекулярных основах регуляции действия генов. Она явилась именно тем ферментом, изучение биосинтеза которого на уровне транскрипции у бактерий позволило Львову, Жакобу и Моно в начале 60-х годов разработать теорию переноса генетической информации и регуляции синтеза белка (концепция оперона). Согласно этой концепции, в каждый оперон входят ген-регулятор, промотор, оператор и структурные гены определенных белков (цистроны), с которых транскрибируется соответствующая иРНК (полицистронная) и за работу которых ответственны

три предшествующих регуляторных участка двойной спирали ДНК.

Первые исследования механизма генетического контроля были посвящены синтезу β -галактозидазы, которая в клетке *E.coli* осуществляет гидролиз дисахарида лактозы до моносахаридов глюкозы и галактозы. Опыты привели к открытию белка-репрессора лактозного оперона, инициирующего транскрипцию структурных генов (в данном случае, гена β -галактозидазы, а также пермеазы и галактозид-трансацилтилазы). Это достигается путем связывания репрессора с оператором участком ДНК длиной в 21 нуклеотид, перекрывающимся с последовательностью промотора. В результате блокируется доступ РНК-полимеразы к ее участку связывания, и транскрипция цистронов делается невозможной. Для индукции и репрессии синтеза белка, т.е. изменения скорости процесса в противоположных направлениях, необходимо наличие в модели регуляторного механизма еще одного элемента индуктора, который должен, с одной стороны, контролировать действия белка-репрессора лактозного оперона, а с другой, быть связанным прямо или косвенно с функцией синтезируемого фермента. Такой индуктор действительно был обнаружен, и им оказался субстрат β -галактозидазы — лактоза, точнее, аллолактоза.

β -Галактозидаза является индуцибельным ферментом, скорость синтеза которого зависит от состава и условий среды, в частности, концентрации лактозы. Количество фермента с ростом концентрации субстрата резко возрастает. Так что связь индуктора с β -галактозидазой очевидна. Воздействие лактозы через аллолактозу на репрессор имеет аллостерический характер. Когда внутриклеточное содержание лактозы начинает превышать норму, увеличивается концентрация аллолактозы, которая индуцирует конформационные изменения в молекуле репрессора. Его связь с ДНК ослабляется, и он освобождает промотор и тем самым дает возможность РНК-полимеразе транскрибировать гены β -галактозидазы. Наступает дерепрессия гена, образуется иРНК и начинается синтез фермента, который необходим только тогда, когда в клетке присутствует лактоза.

Недавно была исследована трехмерная структура β -галактозидазы *E.coli* с разрешением 2.5 Å.¹⁹⁶ Рентгеноструктурный анализ показал, что аминокислотная последовательность белка из 1023 остатков имеет N-концевой α -пептидный участок 1–51 вытянутой формы и пять структурно автономных доменов: 51–217 (I), 220–334 (II), 334–627 (III), 627–736 (IV) и 736–1023 (V). В отличие от ДНК-топоизомеразы типа I, где полипептидная цепь проходит от одного незавершенного домена к другому и, не закончив его построения, направляется к третьему и т.д. (см. схему 5), у галактозидазы цепь проходит от N-конца молекулы к ее C-концу через все домены строго последовательно. Тем самым облегчается сборка длинной полипептидной цепи белка, поскольку при модульной структурной организации нативного фермента каждый домен может действовать как независимая свертывающаяся субъединица.

Ферментативную активность проявляет четвертичная структура β -галактозидазы в виде гомотетрамерного невалентного комплекса молекулярной массы 465 кДа. Структурный анализ показал, что комплекс принадлежит к точечной группе симметрии 222. Четыре тетрамера составляют асимметричную элементарную ячейку пространственной группы $P2_1$ с параметрами $a = 107.9$, $b = 207.5$, $c = 509.9$ Å и $\beta = 94.7^\circ$. На сегодняшний день из всех идентифицированных на атомном уровне трехмерных структур белков структура молекулы β -галактозидазы обладает самой длинной полипептидной цепью. Работа¹⁹⁶ впервые продемонстрировала возможность исследования кристаллов белка с размерами элементарной ячейки, превышающими 500 Å, и относительной молекулярной массой ~2000 кДа на асимметричную единицу.

Ранее было показано, что остатки Glu-461, Met-502, Tyr-503 и Glu-537 должны играть важную роль или непосредственно в самой каталитической реакции, или в построении активного центра.^{197, 198} Действительно, в найденной пространственной структуре фермента они оказались сближенными друг с другом и расположенными около глубокой ямы, по-видимому, представляющей собой субстрат-связывающий карман. Формирующие его остатки, как и четыре отмеченные выше остатка, относятся к высококонсервативным.

VI. Белки скелетных мышц

К одному из самых удивительных свойств белков, не проявляющихся у других соединений, бесспорно, относится их способность к макроскопическому, т.е. значительно превышающему размеры собственных молекул, перемещению. Оно обусловлено наличием у ряда белков, получивших название аллостерических, нескольких энергетически наиболее предпочтительных и сравнительно легко переходящих друг в друга конформаций, чувствительных к изменению внешней среды и избирательно взаимодействующих с другими молекулами. При потреблении энергии конформационные переходы теряют обратимость и становятся упорядоченными; перемещение обретает направленность, и белок совершает полезную работу.¹⁹⁹ Он может, например, «пройти» вдоль тонкой нити филамента, микротрубочки или двойной спирали ДНК. Такими аллостерическими, «шагающими» белками, использующими энергию гидролиза АТФ, являются ДНК-геликаза, участвующая в репликации ДНК, кинезин и дайнеин, обеспечивающие внутриклеточную подвижность, и мышечный белок миозин, структуре и функциям которого в основном посвящен этот раздел.

Миозин является многофункциональным белком. В сокращении скелетных, сердечных и гладких мышц и во внутриклеточных движениях он одновременно выполняет, по крайней мере, три ключевых функции: структурную, аллостерическую и ферментативную. Наиболее полезная информация о функциях миозина была получена при исследовании поперечнополосатых скелетных мышц, сокращающихся произвольно, а также аналогичных тканей беспозвоночных, прежде всего летательных мышц насекомых. Электронно-микроскопическое изучение продольных и поперечных тонких срезов скелетных мышц, впервые проведенное в 1953 г. Хаксли,²⁰⁰ выявило высокий уровень их структурной организации. Уже в следующем году он²⁰¹ предложил так называемую модель скольжения нитей, которая имела основополагающее значение для понимания природы и молекулярного механизма мышечных сокращений.

Скелетные мышцы — это пучки мышечных волокон, наиболее крупным повторяющимся структурным элементом которых является миофибрилла, цилиндрическая нить диаметром 1–2 мкм (1000–2000 Å), идущая от одного конца клетки до другого. Миофибрилла, в свою очередь, содержит белковые филаменты двух типов — толстых и тонких. Основной белок толстых нитей — миозин, тонких — актин. Миозиновые и актиновые филаменты в миофибрилле строго упорядочены. Функциональной сократительной единицей миофибриллы является саркомера, имеющая длину около 2.5 мкм и разделяющаяся на I- и А-диски (рис. 16). Толстые филаменты (длина ~1.6 мкм и толщина 0.015 мкм) тянутся от одного края А-диска до другого, а тонкие (длина ~1.0 мкм и толщина 0.008 мкм) идут от Z-линии и заходят в промежутки между толстыми филаментами А-диска. При мышечном сокращении каждая саркомера укорачивается пропорционально всей мышце, причем сжимается только I-диск, а плотный А-диск не изменяет своих размеров. Суть модели скольжения филаментов²⁰¹ в том, что сокращение миофибриллы, а следовательно, и мышечного волокна происходит в результате скольжения толстых филаментов относительно тонких при сохранении длин тех и других.

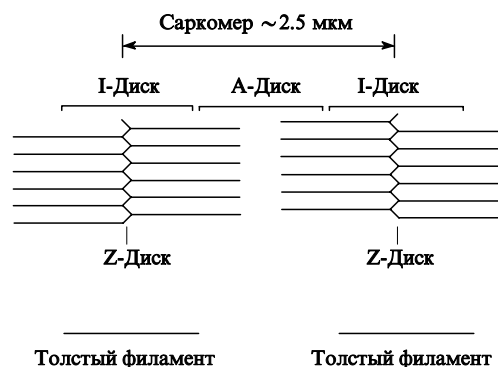


Рис. 16. Схема строения саркомера

Модель скольжения нитей прошла длительную опытную проверку и наиболее убедительно была подтверждена данными прямых методов электронной микроскопии и рентгеноструктурного анализа. Они показали, что укорочение мышц действительно не сопровождается изменениями собственных длин филаментов и характера их упаковки в саркомере. Развиваемая мышцей сила оказалась пропорциональной степени взаимного перекрывания миозиновых и актиновых нитей и тем самым обусловленной их взаимодействиями на всем перекрывающемся участке. С появлением электронной микроскопии высокого разрешения (вторая половина 60-х годов; 20–40 Å) удалось увидеть множество боковых отростков, образующих поперечные мостики ~0.013 мкм (~130 Å) между толстыми и тонкими филаментами. Стало очевидно, что относительное перемещение нитей совершается с помощью этих мостиков. Они принадлежат миозину и работают, используя энергию гидролиза АТФ, подобно миниатюрным веслам. О том, что АТФ присутствует в мышечных волокнах, было известно с 1929 г., поскольку именно из мышц он был впервые выделен. А то, что миозин катализирует гидролиз АТФ, т.е. является АТФазой, установили Энгельгардт и Любимова в 1939 г.²⁰² Это открытие явилось прямым указанием на источник энергии для сокращения мышц и роль миозина в использовании энергии.

К началу 70-х годов феноменологическая стадия исследования функционирования мышц была в основном завершена; стали известны общая схема процесса, его основные участники и источник энергии.^{203–206} Дальнейшее изучение заключалось в поиске ответов на вопросы о том, каков молекулярный механизм сокращения мышц, как на молекулярном уровне совершается трансформация химической энергии гидролиза АТФ в механическую работу и каким образом нервный импульс приводит в движение мышечные волокна.

Изучение этой проблемы начинается с экспериментальных структурных исследований методами электронной микроскопии, особенно криоэлектронной микроскопии, которая при благоприятных условиях может привести к разрешению на атомном уровне,^{207, 208} рентгеновской дифракции ориентированных волокон и рентгеновской кристаллографии. В последнее время (90-е годы) постепенно входит в практику комбинированный подход, использующий результаты как электронной микроскопии, так и рентгеноструктурного анализа для построения согласующихся с данными двух методов атомных моделей трехмерных структур белковых молекул.²⁰⁹ Подход уже нашел применение в исследованиях мышечных белков и сферических вирусов.^{210–212}

1. Структура актиновых нитей

В состав тонких филаментов входят актин, составляющий, как уже отмечалось, основу нитей, тропомиозин и тропонин. Стандартная процедура выделения актина заключается в экстракции высушенной и измельченной мышечной ткани разбавленным солевым раствором. Такая обработка расщепляет актиновые филаменты на глобулярные субъединицы, каждая из которых образована одной полипептидной цепью с молекулярной массой 41,8 кДа; это глобулярный актин или G-актин. С каждой молекулой G-актина связан один ион Ca^{2+} , стабилизирующий ее глобулярную конформацию. Кроме того, с G-актином невалентно ассоциирована одна молекула АТФ. При невалентной полимеризации глобулярного актина концевой фосфат АТФ отщепляется и образуется фибриллярный актин или F-актин. Полимеризацию можно вызвать повышением концентрации соли до уровня, близкого к физиологическому. Процесс не требует затраты энергии, хотя и сопровождается гидролизом АТФ, который значительно повышает скорость полимеризации и оказывает влияние на его динамику. По данным электронной микроскопии актиновые филаменты состоят из двух цепей глобулярных молекул, длина которых равна $\sim 65 \text{ \AA}$, а толщина в самой широкой части $\sim 40 \text{ \AA}$. Цепи F-актина образуют двойную спираль, имеющую 13 молекул в шести витках, повторяющихся каждые $360 \text{ \AA}$ (см.²¹³).

После многолетних попыток молекулы G-актина удалось закристаллизовать, причем только вместе с молекулами ДНКазы I в отношении 1 : 1. Поэтому трехмерная структура мономерного актина на атомном уровне стала известна из данных рентгеновской кристаллографии комплекса G-актин—ДНКазы I (см.²¹⁴). Одновременно была получена картина рентгеновского рассеяния F-актинового волокна с разрешением $6 \text{ \AA}$ и найдена ориентация G-актинового мономера в двойной спирали полимера путем сравнения рассчитанных картин рентгеновской дифракции с наблюдаемой.²¹³ Оставшиеся неустраненными различия отражают тот факт, что полимеризация актина сопровождается незначительными конформационными изменениями, но лишь отчасти, поскольку использование уточненной структурной модели G-актина в построении модели F-актиновой нити привело недавно к лучшему совпадению результатов расчета с экспериментальными данными.²¹⁵ Дальнейшее уточнение модели затруднено отсутствием для F-актина картины рентгеновской дифракции более высокого, чем $6 \text{ \AA}$, разрешения. Выход может быть найден при обращении к теоретическому подходу и использованию методов конформационного анализа²¹⁶ и молекулярной динамики.²¹⁷ Атомная модель F-актина, построенная путем согласования данных рентгеноструктурного анализа кристаллов G-актина и тонких филаментов F-актина, совпала с атомной моделью, реконструированной по снимкам криоэлектронной микроскопии актиновых нитей.^{218, 219}

С каждым актиновым филаментом тесно ассоциированы два вспомогательных белка, тропомиозин и тропонин, главная функция которых заключается в регуляции мышечных сокращений в зависимости от концентрации ионов Ca^{2+} и, следовательно, нервных импульсов. Жесткие палочковидные α -спиральные молекулы тропомиозина длиной $\sim 400 \text{ \AA}$ лежат в продольных бороздках, тянущихся вдоль актинового филамента, придавая тем самым двойной спирали F-актина необходимую жесткость (рис. 17). Глобулярная форма тропонина построена из трех разных субъединиц (тропонина Т, I и С). Тропонин Т имеет участок для связывания тропомиозина и ответствен за прикрепление всего комплекса к актиновому филаменту. При добавлении тропонина I к тропонину Т и тропомиозину образуется комплекс, препятствующий взаимодействию актина с миозином даже в присутствии ионов Ca^{2+} . При наличии тропонина С этот комплекс продолжает блокировать взаимо-

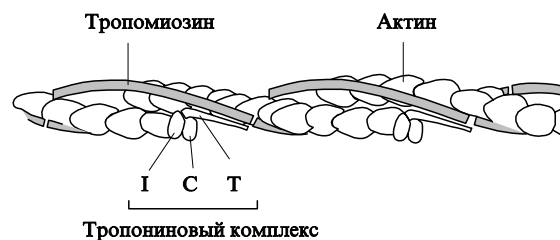


Рис. 17. Схематическое изображение тонкого филамента

действие миозина с актином, но только в отсутствие Ca^{2+} . При появлении в среде свободного кальция тропонин С связывает четыре иона Ca^{2+} и в таком состоянии снимает блокаду. Именно этот эффект и лежит в основе возбуждения мышечного сокращения ионами кальция. К вопросу о том, каким образом тропомиозин и тропонин контролируют взаимодействие миозина с актином, вернемся после рассмотрения структурной организации толстых филаментов.

2. Структура миозиновых нитей

Содержание миозина, актина, тропомиозина и тропонина в миофибриллах составляет примерно 55, 25, 15 и 5% соответственно. Отличительная черта миозина скелетных мышц заключается в его способности спонтанно образовывать в условиях *in vitro* гигантские полимерные комплексы, намного превосходящие агрегаты миозина немuscularных тканей. Из скелетных мышц миозин извлекается концентрированными соевыми растворами, в которых он хорошо растворим. Обработанная таким образом мышца теряет только толстые филаменты, которые распадаются на составляющие их молекулы миозина, имеющего молекулярную массу $\sim 520 \text{ кДа}$. При обработке концентрированным раствором мочевины или другим детергентом молекула миозина распадается на шесть полипептидных цепей: две идентичные тяжелые цепи с молекулярной массой $\sim 220 \text{ кДа}$ и две пары легких цепей с молекулярной массой ~ 22 и $\sim 15 \text{ кДа}$ (см.^{220–224}). Впервые в 1963 г. с помощью электронной микроскопии было установлено,²²³ что миозин состоит из двух глобулярных «головок», каждая из которых прикреплена к тяжелой цепи, содержащей длинный участок α -спирали. В нативной молекуле миозина α -спирали двух тяжелых цепей закручены одна вокруг другой в суперспираль, образующую палочковидный хвост, из которого выступают две головки. Каждая головка образована глобулярной частью тяжелой цепи ($\sim 95 \text{ кДа}$) и включает по одной молекуле легкой цепи двух видов (рис. 18).

Толстые филаменты образуются путем ассоциации молекул миозина за счет их палочковидных хвостов: несколько сотен молекул, располагаясь параллельно со сдвигом по длине, формируют пучок, из которого выступают латераль-

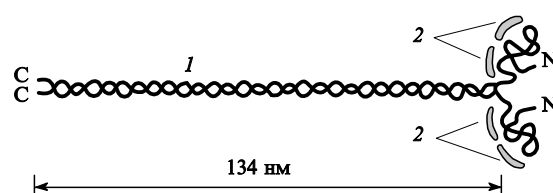


Рис. 18. Схема построения молекулы миозина; 1 — скрученные α -спирали, 2 — легкие цепи



Рис. 19. Схематическое изображение толстого филамента скелетной мышцы

но расположенные головки (рис. 19). Вся структура биполярна. Выступающие головки отсутствуют лишь на небольшом срединном участке филамента, где соединяются два противоположно направленных пучка миозиновых хвостов. Глобулярные головки миозиновых молекул взаимодействуют с актином и образуют поперечные мостики между толстыми и тонкими филаментами.

Протеолиз тяжелых филаментов показал, что миозиновая головка легко отделяется от остальной части белка, образуя так называемый субфрагмент-1 (S1) и суперспиральный стержень, ответственный за самосборку миозина и создание структурной основы толстых нитей.^{220, 225} Субфрагмент-1 содержит нуклеотидсвязывающий активный центр для АТФ, актин-связывающую поверхность и две области контактов с легкими цепями. Таким образом, глобулярная головка и вне филамента сохраняет все свои функции. Входящие в нее легкие цепи отличаются друг от друга по структуре и свойствам. В некоторых видах миозина они не оказывают заметного влияния на АТФазную активность фермента.²²⁶ Однако в других видах миозина легкие цепи его головки могут участвовать в регуляции гидролиза АТФ, но только в присутствии актина.^{227, 228}

Еще в конце прошлого века отмечалось, что миозин обладает двойным лучепреломлением. Однако до самого последнего времени все знания о пространственной структуре ограничивались информацией о внешнем очертании молекулы и ее размерах, полученных с помощью электронной микроскопии. В частности, было известно, что миозиновая головка имеет грушевидную форму ~ 190 в длину и $50 \text{ \AA}$ в ширину, а двойная спираль хвостового участка ~ 1500 и $\sim 20 \text{ \AA}$ соответственно.^{228–231} Рейменту и соавт.²³² удалось получить требуемые кристаллы для анализа, используя не совсем обычный в белковой кристаллографии прием N-метилования в мягких условиях боковых цепей всех остатков Lys миозинового фрагмента-1. Чтобы убедиться в том, что метилирование не привело к радикальному изменению конформационных и ферментативных свойств белка, авторы подвергли подобной химической модификации лизоцим и не обнаружили после этой процедуры существенных нарушений в трехмерной структуре фермента. Кроме того, были проверены кинетические свойства метилированного миозина S1 (см.²³³). Он сохранял каталитическую активность, хотя и наблюдались отклонения кинетических параметров гидролиза АТФ от их значений у нативного образца.

Трехмерная структура субфрагмента-1 миозина была определена^{232, 234, 235} с помощью рентгеноструктурного анализа с разрешением $2.8 \text{ \AA}$. В результате были не только уточнены внешние размеры миозиновой головки, которые подтвердили, что она лишена какой бы то ни было симметрии и имеет в длину $165 \text{ \AA}$, а в утолщенном месте $65 \times 40 \text{ \AA}$ в сечении, но и построена атомная модель из 1072 аминокислотных остатков (из общего количества 1157). Структура содержит много α -спиралей ($\sim 48\%$), из которых самая длинная простирается на $85 \text{ \AA}$ от утолщенного места в направлении С-конца тяжелой цепи S1. Большую часть этой спирали обволакивают легкие цепи, ELC (essential light chain) и RLC (regulatory light chain), одно из основных назначений которых — конформационная стабилизация тяжелой цепи

миозиновой головки (при удалении, например, RLC структура S1 разрушается).²³⁶ Помимо этого, легкие цепи способны конформационным перестройкам, происходящим при связывании и освобождении нуклеотида в утолщенной части головки. Для того чтобы облегчить описание трехмерной структуры субфрагмента-1, его тяжелую цепь целесообразно разделить на три части: N-концевую, включающую остатки Asp-4—Glu-204, центральную Gly-216—Tyr-626 и С-концевую Gln-647—Lys-843. Между ними находятся лишние вторичных структур петли, которые легко поддаются триптическому расщеплению, образуя фрагменты тяжелой цепи с молекулярными массами 25, 50 и 20 кДа.

Утолщенная часть миозиновой головки содержит нуклеотидный и активный центры связывания и, таким образом, имеет все необходимые для генерации движения компоненты. Непосредственно двигательная, моторная часть миозина представляет собой комплекс вторичных структур, расположенных вокруг β -слоя, состоящего из семи, в основном параллельных, β -тяжей. В нее входят компоненты всех трех расщепляемых трипсином фрагментов тяжелой цепи. Нуклеотид-связывающий пакет локализован на конце центрального β -складчатого листа и примыкает с одной стороны к фрагменту с 25 кДа, а с другой — 50 кДа. Локализация аминокислотных остатков, формирующих нуклеотидный активный центр миозина, определена с помощью метода меченых атомов²³⁷ и по аналогии с последовательностями фосфатных петель в структурах аденилаткиназы и RNАазы.^{238, 239} Связывающий пакет имеет глубину $\sim 13 \text{ \AA}$ и приблизительно такую же ширину. Поскольку кристаллы были выращены в отсутствие АТФ, то в найденной структуре миозинового субфрагмента-1 активный центр отвечает открытой конформации.

Взаимосвязь гидролиза АТФ с мышечным сокращением, обнаруженная, как отмечалось, еще в 1939 г., рассматривалась в большой серии кинетических исследований. Результаты, полученные впервые в 1971 г.²⁴⁰ и в последующие годы,^{234, 241–243} не претерпели принципиальных изменений и приводят к одному и тому же представлению об актинмиозиновом механизме сокращения мышц. Он показан на рис. 20 и соответствует четырехтактному процессу перехода энергии гидролиза АТФ в механическую работу. На первом этапе (a) предполагаемого механизма миозиновая головка, несущая продукты гидролиза АТФ (АДФ и фосфат), прикрепляется к активному филаменту. Второй этап (b) («рабочий ход») начинается с изменения конформации головки, вызванного ее взаимодействием с актином, что приводит к освобождению продуктов гидролиза и возникновению в актомиозиновом комплексе напряженности, разрежающейся при продольном перемещении тонкого филамента. По завершению движения возникают условия для присоединения к миозиновой головке новой молекулы АТФ, что сопровождается разрушением актинмиозиновых контактов (этап c). Цикл заканчивается гидролизом АТФ и изменением конформации головки, которая принимает первоначальное положение (этап d). Предполагается, что каждая головка молекулы миозина проходит свой цикл независимо.

Таким образом, наиболее существенные черты механизма действия актомиозинового комплекса заключаются в том, что, во-первых, реакция гидролиза АТФ совершается в то время, когда миозин не взаимодействует с актином, и, во-вторых, движущая сила процесса возникает при освобождении продуктов АДФ и γ -фосфата.

С описанным представлением о том, как миозиновые головки «шагают» вдоль актиновых филаментов, согласуются не только результаты кинетических исследований, но и множество экспериментальных данных, полученных с использованием других методов. В частности, общепринятое представление подтверждают ставшие известными совсем недавно трехмерные структуры мономерного актина^{213, 214} и миозиновой головки,^{232, 234} а также построенная на их

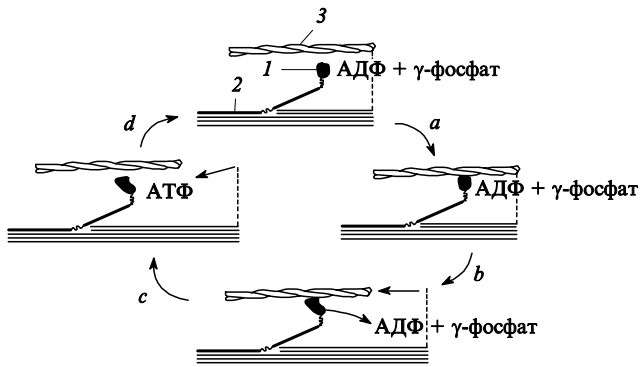


Рис. 20. Схема механизма использования энергии гидролиза АТФ для передвижения актинового филамента относительно миозинового; 1 — миозиновая головка, 2 — толстый филамент, 3 — тонкий филамент

основе с привлечением данных криоэлектронной микроскопии структурная модель актомиозинового комплекса с разрешением 5–8 Å (см.²³⁵). Одна из ключевых особенностей этого комплекса, ставшая очевидной после создания модели, заключается в существовании невалентных контактов между актином и С-концевым доменом триптического фрагмента 50 кДа. Взаимодействия такого вида могут стимулировать конформационные изменения миозина в момент его сближения с актином на втором этапе процесса сокращения мышцы (см. рис. 20). Недавно при изучении скелетных мышц методом малоуглового рентгеновского рассеяния были получены данные, убедительно свидетельствующие о существенном изменении формы миозиновой головки при нуклеотидном связывании.²⁴⁴

Конформационная перестройка миозина сопровождается аллостерическим эффектом — смыканием длинной узкой щели, находящейся на границе между толстой и тонкой половинами грушевидной головки. Результатом становятся сближение актина с нуклеотидным центром миозина и высвобождение АДФ и неорганического фосфата. В этом причина того, почему миозин представляет собой актин-зависимую АТФазу. Давно было замечено, что этапом, лимитирующим скорость каталитической реакции, является не связывание молекулы АТФ в активном центре и не собственно гидролиз, а освобождение продуктов ферментативной реакции, остающихся прочно связанными с миозином, что и препятствует началу следующего каталитического акта.^{203, 204} АТФазная активность очищенного миозина невелика: для гидролиза одной молекулы АТФ ферменту требуется ~30 с. В присутствии актина каждая молекула миозина способна гидролизовать от 5 до 10 молекул АТФ в секунду.

Толстый филамент содержит ~500 миозиновых головок, и все они работают одновременно, но не синхронно, втягивая актиновую нить. В новом цикле взаимодействия с актином головка присоединяется к другому мономеру тонкого филамента, расположенному ближе к Z-пластинке. Предельное сокращение мышцы развивается в сотые доли секунды (~0.02 с). Покоящаяся мышца эластична и легко растягивается. Сокращенная мышца, наоборот, неэластична и жесткая; растяжению препятствуют связи между актиновыми и миозиновыми нитями, сохраняющиеся при недостаточной концентрации АТФ.

Сокращение скелетной мышцы происходит при включении потенциала действия нервного волокна и получении сигнала от соответствующего мотонейрона. Электрическое возбуждение быстро распространяется по так называемым Т-трубочкам, которые окружают каждую миофибриллу в

области Z-пластинок. Здесь электрический сигнал передается на саркоплазматический ретикулум — систему разветвленных, сообщающихся между собой пузырьков. В момент активации электрическим импульсом, прошедшим по Т-трубочкам, саркоплазматический ретикулум выбрасывает в цитозоль большие количества ионов Ca^{2+} , запасенных в пузырьках, что инициирует сокращение миофибрилл. Сигнал от мембраны мышечной клетки через Т-трубочки и саркоплазматический ретикулум доходит до саркомеры за несколько миллисекунд, поэтому все миофибриллы мышечной клетки сокращаются практически одновременно. Связь мышечного сокращения с изменениями концентрации Ca^{2+} обусловлена функциями вспомогательных белков тропомиозина и тропонина, ассоциированных с актиновыми филаментами (см. рис. 17). Они участвуют в регуляции мышечного сокращения ионами Ca^{2+} и тем самым делают АТФазную активность миозина чувствительной к концентрации этих ионов.

Предполагается, что тропомиозин и тропонин осуществляют Ca^{2+} -зависимую регуляцию мышечного сокращения стерическим препятствованием взаимным контактам актина и миозина. При повышении концентрации ионов Ca^{2+} молекулы тропомиозина изменяют свое положение, быть может, благодаря изменению формы связанных с ним молекул тропонина, прежде всего тропонина С. В отсутствие Ca^{2+} тропомиозин, тропонин Т и тропонин I образуют комплекс, препятствующий взаимодействию актина с миозином. При появлении ионов кальция тропонин С связывает четыре иона Ca^{2+} и в таком состоянии снимает блокаду и дает возможность головкам миозина вступить во взаимодействие с актином.²⁴⁵

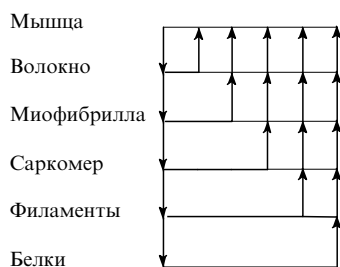
Установление атомных трехмерных структур белков G-актина и миозинового субфрагмента-1 и воссоздание на этой основе и с привлечением электронной микроскопии и малоуглового рентгеновского рассеяния пространственного строения тонкого и толстого филаментов означает почти полную визуализацию элементарной составляющей саркомеры, способной демонстрировать принципы сокращения скелетных мышц и конкретный конформационно-электронный механизм трансформации химической энергии в механическую работу. Разработка атомно-молекулярной модели актомиозинового комплекса явилась одним из выдающихся достижений молекулярной биологии последних лет как в методическом, так и в чисто научном отношении. Не останавливаясь подробно и на значительно расширившихся в последние годы возможностях в экспериментальном исследовании процесса мышечных сокращений,²⁴⁶ отметим лишь, что наиболее заметным событием здесь явилось привлечение хорошо дополняющих рентгеноструктурный анализ и электронную микроскопию методов молекулярной генетики²⁴⁷ и метода «лазерной ловушки».²⁴⁸ Последний позволяет наблюдать за перемещениями единичных белков в 100–200 Å и измерять силу их взаимодействий до 7 пН ($7 \cdot 10^{-7}$ дин). Ниже остановимся на дальнейшем совершенствовании самой модели, на проблеме перехода от феноменологического описания механизма действия молекулярного мышечного мотора к созданию строгой теории сокращения мышц и количественного метода анализа этого процесса.

Модель Реймента и Холдена обобщает данные не только собственных работ авторов и их сотрудников,^{232, 234, 235} она является логическим завершением цикла многочисленных исследований последних четырех десятилетий, и прежде всего исследований 90-х годов, G- и F-актина с помощью рентгеноструктурного анализа и криоэлектронной микроскопии.^{213, 214, 218, 246}

Связь между знанием строения мышечной системы и пониманием механизма ее действия, т.е. между морфологией различных уровней структурной организации и физиологией мышцы, иллюстрирует схема 6. Жирные стрелки указывают направление последовательного ступенчатого

процесса познания структуры, а противоположно ориентированные тонкие стрелки — процесса познания функции биосистемы. Из приведенной схемы очевидно, что чем полнее и детальнее информация о форме и составе простейших подсистем, тем глубже понимание механизма функционирования всей системы. Такой характер зависимости глубины проникновения в сущность физиологического явления от знания морфологии его участников является общей чертой процессов познания всех биологических систем. Трактовка свойств биологической системы всегда относительна и основывается на информации о структуре нижестоящих подсистем.

Схема 6



Наличие общих особенностей и единого принципиального плана развития исследований биосистем, несмотря на их, быть может, самоочевидность, ведут к нетривиальным заключениям, представляющим особую актуальность в настоящее время. Развитие биологии в течение всей истории определялось двумя встречными потоками исследований: морфологическим, направленным от сложноорганизованных объектов и явлений к более простым, и физиологическим, имеющим противоположную направленность. Ведущим всегда являлся первый поток, а ведомым — второй. Однако в начале второй половины XX века биология в своем движении от сложного к простому, обусловленном достижениями в морфологии, дошла до самого универсального и простейшего уровня биосистем — своего молекулярного «дна». Развитие в том же плане (от морфологии к физиологии) и в том же направлении (от сложного к простому) становится невозможным. Привычный источник получения качественно новой информации иссяк, поскольку морфологические данные о возможных нижестоящих подсистемах (отдельных аминокислот, атомных групп, атомов) не содержат биологической специфики и, следовательно, прямо не связаны с функцией любой рассматриваемой биосистемы.

Таким образом, используемый биологией подход завершается установлением с помощью рентгеноструктурного анализа, электронной микроскопии или иного экспериментального метода трехмерных структур белков. На основе опытных данных о структуре биосистемы молекулярного уровня подтверждаются существовавшие ранее или формируются новые, более детальные и обоснованные представления о механизме функционирования, разрабатывается атомно-молекулярная модель процесса и формируется соответствующая гипотеза. По существу, делается все то, что делалось и ранее в отношении сложноорганизованных биосистем при получении новой информации о морфологии нижестоящих подсистем.

Важна роль рентгеноструктурного анализа белков в том, что с его помощью началось изучение биосистем на молекулярном уровне, без чего трудно представить становление молекулярной биологии.

Что же требуется для дальнейшего прогресса биологии и ее перехода в следующее, более совершенное качественное состояние? Поскольку пути развития исследований всех биосистем в принципе совпадают, то ответ на поставленный вопрос не потеряет своей значимости и общности, если будет получен при рассмотрении какого-либо конкретного

объекта, например, того же актомиозинового комплекса. Какую же нужно иметь дополнительную информацию (помимо морфологической) о структурах миозина, актина и некоторых других белков, чтобы не только составить гипотетическое представление о работе актомиозинового комплекса и взаимодействиях с питающими его энергией молекулами АТФ и регулируемыми его функционированием ионами Ca^{2+} , а пойти дальше и попытаться понять, почему это происходит? Для этого необходимы данные, причем количественные, о совершающихся конформационных и химических изменениях, их последовательности, побудительных мотивах и взаимообусловленности. При известной пространственной структуре актомиозинового комплекса критерием достоверности знания может служить количественное описание механизма его действия как спонтанно протекающего периодического процесса. Главная проблема здесь заключается не столько в объеме и даже качестве экспериментального материала, сколько в его физико-химическом истолковании, т.е. наличии соответствующих теорий, логически и количественно связывающих между собой аминокислотную последовательность, пространственную структуру и функцию молекулы белка.

VII. Синхротронное излучение

Одним из самых существенных методических достижений рентгеноструктурного анализа последнего десятилетия, по-видимому, можно считать применение в кристаллографии белков синхротронного излучения, значительно более мощного по сравнению с излучением традиционных рентгеновских трубок. В 1960–70-е годы большинство трехмерных структур белков было расшифровано с использованием запаянных острофокусных трубок с медным анодом, имеющих характеристическую длину волны λ (K_α) $\sim 1.54 \text{ \AA}$. Их яркость, оцениваемая потоком фотонов коллимированного рентгеновского пучка ($10^9 - 10^{10}$ фотон $\cdot \text{с}^{-1}$) в несколько раз выше, чем у обычных трубок, а фокусировка пучка на заметно меньшую площадь позволяет получать дифракционные картины с более высоким разрешением и меньшей экспозицией.

В 1959 г. Парратт предложил использовать в кристаллографии в качестве источника рентгеновского излучения синхротрон.²⁴⁹ Заряженные частицы, двигаясь по кругу в синхротроне с релятивистскими скоростями в однородном магнитном поле, начинают испускать при торможении и искривлении траектории сплошной спектр электромагнитных волн в форме очень острого конусового пучка с углом расхождения $\sim 1'$ и осью, совпадающей с мгновенным (тангенциальным) направлением движения. Коротковолновая часть спектра синхротронного (магнитотормозного) излучения имеет широкий максимум в области, представляющей интерес для рентгеноструктурного анализа. Полихроматическая радиация синхротрона, в отличие от традиционных источников, может быть монохроматизирована на значительно большем участке длин волн и, следовательно, дать мощный поток рентгеновских лучей. Так, на синхротроне в Дарсбери (Великобритания) полезный поток фотонов $N(\lambda)$ по меньшей мере в $10^2 - 10^3$ раз более интенсивен, чем у самых совершенных современных рентгеновских трубок с вращающимся анодом. Идея Парратта стала предметом серьезных дискуссий, однако долгое время оставалась нереализованной. Сомнения вызывали как возможность фактического увеличения интенсивности дифракционных пучков, так и способность белковых кристаллов выдерживать интенсивное облучение.²⁵⁰ Лишь в 1971 г. синхротронная радиация была применена в дифракционных исследованиях биологических объектов. Исследования мышечных волокон методом малоуглового рассеяния показали, что использованное синхротронное излучение после монохроматизации и фокусировки на два порядка превосходит макси-

Таблица 8. Некоторые данные рентгеноструктурного анализа белков, полученные с использованием синхротронного излучения и излучения рентгеновских трубок с вращающимся анодом

№ п/п	Белок	Источник	Молекулярная масса, кДа	Данные о структуре	Разрешение, Å	R-фактор, %	Примечание	Ссылки
1	Гемагглютинин	<i>Influenza virus</i>	60	Гомотримерные комплексы гликопротеина с рецепторными аналогами	2.15	21.6	Размеры кристалла 0.70 × 0.70 × 0.70 мм; синхротронное излучение $\lambda = 0.905 \text{ Å}$; температура 108 K	257
2	Бактериальный трипсин	<i>Noncardiopsis</i>	20	Мономер	0.96	10.7	Гомотримерные комплексы гликопротеина с рецепторными аналогами. Трубка, CuK_α	258
3	Цитохром-с-пероксидаза (ССР)	Дрожжи	34	Fe-гемсодержащий фермент	2.2	15.8	Размеры кристалла 0.40 × 0.40 × 1.0 мм; полихроматическое синхротронное излучение (дифракция Лауэ); время одной экспозиции 300–400 мс; температура 279 K	259
4	Транскетолаза	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	148	Гомодимер	2.0	15.7	Синхротронное излучение	260
5	n-Гуанидин-бензоил-замещенный трипсин	Бык	24	Мономер	2.0	22.1	Размеры кристалла 1.0 × 0.40 × 0.40 мм; полихроматическое синхротронное излучение (дифракция Лауэ); время одной экспозиции 800 мс; pH 5.5–8.5	261
6	β-Галактозидаза	<i>E.coli</i>	465	Гомотетрамер	2.5	19.3	Синхронное излучение	262
7	Глюкозодегидрогеназа	<i>Thermoplasma acidophilum</i>	160	Гомотетрамер	2.9	12.4	Размеры кристалла 1.50 × 0.30 × 0.20 мм; трубка, CuK_α и синхротронное излучение	263
8	Ренин	Мышь	40	Фермент-ингибиторный комплекс	2.0	18.0	Трубка, CuK_α (разрешение 3.0 Å) и синхротронное излучение (разрешение 2.0 Å)	264
9	Галогеналкандегидрогеназа	<i>Xanthobacter autotrophicus</i>	36	Мономер	1.9	16.6	Размер кристалла 0.40 × 0.40 × 0.15 мм; трубка, CuK_α ; время экспозиции 48 ч	265
10	Гормон роста	Человек	22	Мономер	2.0	18.5	Размеры кристалла 0.25 × 0.25 × 0.15 мм; трубка, CuK_α	266
11	Аконитаза	Бык, свинья	83	Комплексы фермента с транс-аконитатом и нитроцитратом	2.05	17.0	Размеры кристалла 0.70 × 0.70 × 0.20 мм; трубка, CuK_α ; время экспозиции 12–18 дн	267
12	Пируватоксидаза	<i>Lactodacillus plantarum</i>	270	Гомотетрамер	2.1	16.2	Размеры кристалла 0.70 × 0.70 × 0.70 мм; трубка, CuK_α и синхротронное излучение; температура 277 K	268
13	Крамбин	<i>Crambe abyssinica</i>	5.5	Мономер	0.83	10.5	Трубка, CuK_α , температура 130 K	269
14	Токсин II	<i>Androctonus australis</i>	7	Мономер	1.3	14.8	Трубка, CuK_α	270
15	Онкомодулин	Опухолевые клетки	12	Мономер	1.3	16.9	Размеры кристалла 0.20 × 0.60 × 0.80 мм; трубка, CuK_α	271
16	Антитело Fab 17/9	IgG2 a, k	26	Комплекс Fab 17/9 с пептидом 101–107 гемагглютина вируса гриппа	2.8	19.0	Минимальные размеры кристалла 0.30 × 0.04 × 0.02 мм; трубка, CuK_α ; температура 123 K; время экспозиции свыше 10 дн	272

Таблица 8 (продолжение)

№ п/п	Белок	Источник	Молекулярная масса, кДа	Данные о структуре	Разрешение, Å	R-фактор, %	Примечание	Ссылки
17	Домен GH5 линкерного гистона H5 (фрагмент 24–96)	Эритроциты птицы	8.5	Мономер	2.5	25.0	Синхротронное излучение при трех длин волн 0.9802, 0.9795 и 0.9150 Å, соответствующих полосе поглощения Se. Определение фаз по методу МАД. Рекомбинантная последовательность [Se-Met]-GH5 продуцировалась плазмидами <i>E.coli</i>	273
18	Эндонуклеаза BamH1 (нативная и Se-Met)	<i>Bacillus amiloliquetaciens</i>	25	Гомодимер	1.95	19.0	Трубка CuK _α и синхротронное излучение при длинах волн у края поглощения Se (0.979 Å), пике поглощения (0.978 Å) и в удаленной от поглощения точке (0.900 Å); температура 278 K	274
19	Гонадотропин (нативный и Se-Met)	Человеческий зародыш	28	Гетеродимер (αβ)	2.6	19.9	Синхротронное излучение; аномальная дифракция на четырех длинах волн Se (МАД); температура 277, 293 и 110 K	275
20	Глутамин-5-фосфорибозил-1-пирофосфат, (PRPP)-амидотрансфераза	<i>Bacillus subtilis</i>	210	Гомотетрамер	3.0	22.4	Синхротронное излучение; аномальная дифракция при трех длинах волн на атомах Fe в четырех [4Fe–4S]-кластерах тетрамера (МАД)	276

мальную интенсивность коллимированного фильтрованного CuK_α-излучения рентгеновской трубки и при этом не разрушает облучаемый объект.^{251–253}

Вопрос о возможности применения синхротронного излучения в рентгеноструктурном анализе белковых монокристаллов впервые был рассмотрен как в теоретическом плане,^{254, 255} так и в экспериментальном.²⁵⁶ В последней работе получены рентгенограммы монокристаллов белковых молекул рубредоксина, азурина, фактора роста нервных клеток и L-глутамин-аспарагиназы с использованием электрон-позитронного синхротрона (Станфорд, США).

Авторы показали, что при замене излучения рентгеновской трубки на синхротронную радиацию (при сохранении всех прочих условий эксперимента) интенсивности рассеяния теми же кристаллами белков возрастают более чем в 60 раз и, следовательно, во столько же раз уменьшается время экспозиции. Не сбылись и опасения быстрого распада кристаллов. Напротив, из-за уменьшения экспозиции скорость разрушения исследованных объектов оказалась существенно ниже, чем при использовании излучения рентгеновской трубки. Вместе с упомянутыми достоинствами авторы также отмечают низкое угловое расхождение синхротронного пучка и легкую настраиваемость синхротрона на выбранную длину волны, что облегчает селективную оптимизацию аномальных вкладов в фактор рассеяния. В настоящее время более трети работ в области рентгеновской кристаллографии белка выполняется с использованием синхротронного излучения и многоканальных систем регистрации.

Не менее важным моментом в рентгенографии белков (впрочем, как и во всем современном рентгеноструктурном анализе) явилось появление так называемых координатных (многоканальных) детекторов рентгеновского излучения (или «агеа»-детекторов), позволяющих одновременно регистрировать все дифракционные максимумы от кристалла в данной ориентации. Такие детекторы, представляющие, как

правило, сложные электронные системы одновременной регистрации множества отражений, являются современными аналогами фотографических пленок, использовавшихся ранее на заре рентгеноструктурного анализа. Регистрация одной дифракционной картины («рентгенограммы» с большим числом дифракционных пятен) при заданной ориентации кристалла может составлять несколько секунд или менее, что наряду с мощным источником излучения (синхротроном) приводит к уменьшению времени рентгенодифракционного эксперимента на несколько порядков.

В табл. 8 приведены некоторые данные рентгеноструктурного анализа белков, дифракционные картины которых были получены как при использовании синхротронной радиации (№ 1–8, 17–20), так и излучения рентгеновских трубок с вращающимися медными анодами (№ 9–16). Таблица отражает лишь небольшую часть публикаций конца 1993 – первой половины 1994 г., посвященных расшифровке трехмерных структур белковых молекул и их комплексов. Если судить о достоинствах двух методов по величинам разрешения и фактора расходимости (*R*), то следует заключить, что природа источника излучения практически не отражается на конечном результате. При использовании синхротронного излучения и рентгеновской трубки удалось расшифровать пространственное строение белковых молекул с рекордным разрешением, преодолев в обоих случаях одноангстремный барьер (табл. 8, бактериальный трипсин (№ 2), и крамбин (№ 13)) и достигнув при этом фактора расходимости *R* около 10% — величины, близкой фактору *R* в уточнениях структур небольших органических молекул.

Заметно не отличаются методы и в отношении размеров облучаемого кристалла и диаметра фокусного пятна. Так, при определении трехмерной структуры антитела Fab 17/9 (табл. 8, № 16) с использованием рентгеновской трубки с вращающимся анодом образец имел размеры 0.30 × 0.04 × 0.02 мм, а фокусное пятно составляло всего

0.1 мм. Эти параметры не уступают условиям эксперимента с синхротроном. Можно, однако, полагать, что мощное синхротронное излучение и его острый фокус несколько предпочтительнее, так как при этом можно использовать кристаллы меньших размеров. На сегодняшний день проблема кристаллизации белков в обоих случаях стоит столь же остро, как и десятки лет назад. Особенно сложное положение, как уже отмечалось, имеет место с кристаллизацией мембранных белков (о предпринимаемых здесь усилиях и относительных успехах, см.^{233, 236–238}).

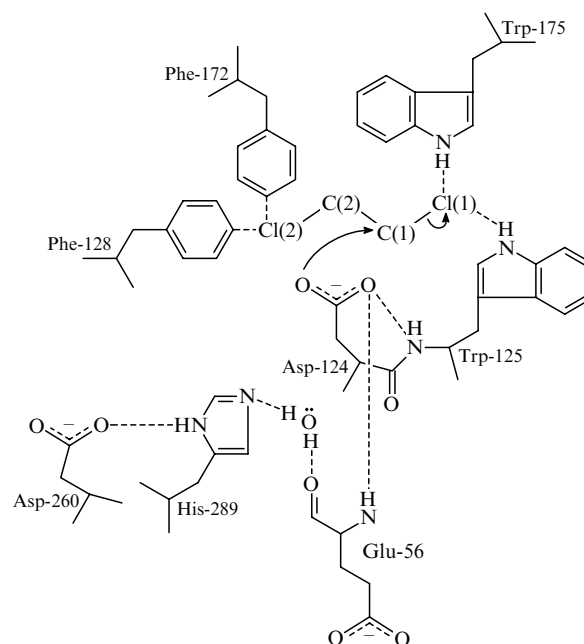
Сопоставление приведенных в табл. 8 данных приводит к выводу, что методы рентгеноструктурного анализа, использующие синхротронное излучение и излучение рентгеновской трубки, не обладают друг перед другом ощутимыми преимуществами при изучении нативных конформаций белковых молекул и их стабильных комплексов, т.е. во всех тех случаях, когда решается статическая задача определения атомных трехмерных структур. До недавнего времени полагали, что в компетенцию рентгеноструктурного анализа по принципиальным соображениям не может входить рассмотрение вопросов, касающихся динамики белков. Использование синхротронного излучения и современных систем одновременного быстрого измерения интенсивностей множества отражений заставило если и не изменить такое представление на противоположное, то во всяком случае поставить под сомнение его безапелляционность. Как видно из табл. 8, возможно снижение времени экспозиции со многих десятков часов (№ 9), дней (№ 16) и даже недель (№ 11) до долей секунд (№ 3 и 5). Согласно работе²⁷⁷ дифракционные отражения белковых кристаллов, облучаемых синхротронной радиацией, могут быть измерены за 100 пс, т.е. 10^{-10} с. Значительное сокращение экспозиции не только позволяет существенно сократить время анализа трехмерной структуры белка, но и открывает принципиально новую перспективу для изучения механизмов протекающих в белковых кристаллах процессов путем исследования структур промежуточных соединений, время жизни которых достаточно продолжительно, или оно может быть пролонгировано при изменении внешних условий. Открывающиеся возможности делают метод рентгеноструктурного анализа еще более уникальным. Можно предположить, что использование синхротронного излучения позволит непосредственно наблюдать за кинетикой конформационных и химических изменений структур белков на атомном уровне по ходу, например, ферментативных реакций. Есть работа, обсуждаемая ниже, в которой такого рода задачу пытаются решить.

1. Механизм функционирования галоалкандегалогеназы

Вершуерен и сотр.^{175, 265} применили рентгеновскую кристаллографию к изучению механизма каталитического акта галоалкандегалогеназы (см. табл. 8, № 10). Структуры фермента, монокристалл которого постоянно находился в маточном растворе, были расшифрованы в отсутствие и присутствии в нем субстрата 1,2-дихлорэтана. При pH=5 и $T = 4^\circ\text{C}$, условия, далеко от оптимального (pH 8.2 и 22°C), субстрат связывался с активным центром, однако развития каталитической реакции не происходило. Образовавшийся невалентный фермент-субстратный комплекс Михаэлиса оставался стабильным как угодно долго, и поэтому его структура могла быть определена при использовании излучения рентгеновской трубки, экспозиции 48 ч и сохранении всех других условий анализа нативного фермента. Найденное расположение субстрата в активном центре в схематической форме представлено на схеме 7. Один атом хлора (Cl(1)) в комплексе располагается на расстояниях 3.6 и 3.2 Å от атомов азота боковых цепей Trp-125 и Trp-175 и взаимодействует с водородами двух связей N—H. Другой атом хлора (Cl(2)) стабилизирован дисперсионными взаимодействиями с бензольными кольцами Phe-128 и Phe-172. В найденной конфор-

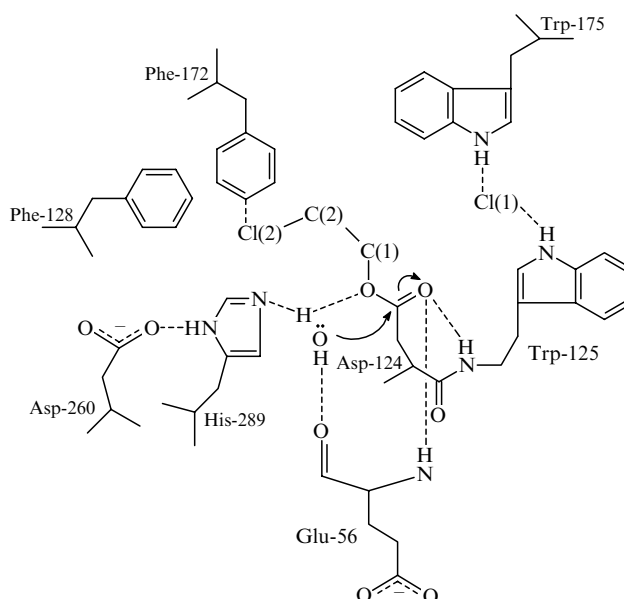
мации субстрата в активном центре атом углерода C(1) сближен с кислородом O^{δ1} боковой цепи Asp-124 (3.8 Å), что главным образом и обуславливает продуктивность невалентного комплекса.

Схема 7



При нагревании кристаллического образца до комнатной температуры происходит разрыв связи C(1)—Cl(1), сопровождаемый образованием иона Cl(1)[−] и алкилированием кислорода O^{δ1} остатка Asp-124. Именно на такое изменение комплекса указывает расшифрованная трехмерная структура, которая возникает и остается стабильной в условиях pH 5 и 22°C (схема 8). Наконец, при pH 6.2 и 22°C алкилированный фермент гидролизует молекулой воды, активированной боковыми цепями взаимодействующих друг с другом остатков His-289 и Asp-260. Продукты реакции удаляются, а фермент возвращается в исходное состояние, что и фиксирует рентгеноструктурный анализ.

Схема 8

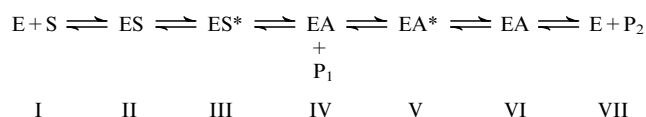


Таким образом, в работе²⁶⁵ экспериментально подтвержден двухступенчатый механизм реакции галоалкандегалогеназы, предложенный ранее.²⁷⁸ В каталитической реакции этого фермента, протекающей в условиях *in vivo*, время жизни интермедиатов слишком коротко для проведения кристаллографического исследования. Авторам удалось путем вариации pH и температуры замедлить процесс, разделить его на две стадии и изучить атомные трехмерные структуры с разрешением 2.0–2.4 Å соответствующих фермент-субстратных комплексов. Показано, что центральную роль на первой стадии — стадии алкилирования, — играет в качестве нуклеофила карбоксильная группа остатка Asp-124, а на второй стадии — деалкилирования, — молекула воды, атакующая центральный атом углерода сложноэфирной группы ковалентного промежуточного соединения.

2. Деацилирование трипсина

Аналогичное исследование было проведено с классическим в энзимологии объектом — трипсином.²⁶¹ В этой работе использован Лауэ-метод регистрации синхротронного излучения с временным разрешением.

Представленная ниже химическая схема каталитического акта сериновых протеаз, в том числе трипсина известна довольно давно.^{279–281}



E — фермент, S — субстрат, A — ацилфермент,

P₁ и P₂ — продукты гидролиза

Механизм триптического гидролиза, согласно предложенной схеме, включает последовательную цепочку химических взаимоотношений между ферментом и субстратом через ковалентные промежуточные соединения. Каталитический процесс начинается с образования невалентного комплекса Михаэлиса (II), в котором гидроксил Ser-195 и имидазольное кольцо His-57 фермента оказываются сближенными соответственно с карбонильной и амидной группами расщепляемой пептидной или сложноэфирной связи субстрата. В результате их согласованных взаимодействий невалентное фермент-субстратное связывание переходит в ковалентное с образованием сначала малоустойчивого промежуточного соединения — так называемого тетраэдрического аддукта (III). Последний распадается на ацилфермент и амин (IV), а при гидролизе сложного эфира — на ацилфермент и спирт. Далее следует деацилирование, которое проходит в принципе аналогичным образом, но в обратном порядке и с участием в качестве нуклеофильного агента не атома O^γ боковой цепи Ser-195, а молекулы воды. Вновь образуется метастабильный тетраэдрический аддукт (V), распадающийся, проходя стадию невалентного комплекса (VI), на исходный фермент и второй продукт реакции (VII). Химический механизм протеолитических сериновых ферментов был разработан до появления результатов рентгеноструктурного анализа пространственного строения их молекул.

Была установлена^{282–287} кристаллическая структура нативного трипсина с разрешением 1.8 Å и уточненная до 1.5 Å. Геометрия активного центра идентифицирована на основе результатов рентгеноструктурного анализа комплексов трипсина с белковыми ингибиторами животного и растительного происхождения^{288–290} и необратимыми синтетическими ингибиторами.²⁹¹ Показано, что во взаимодействии с субстратом и образовании промежуточных продуктов катализа непосредственно участвуют гидроксильная группа остатка Ser-195 и имидазольное кольцо His-57, кото-

рые расположены на поверхности белковой глобулы и образуют водородную связь N^{ε2}...H—O^γ. Остаток His-57 сближен также с Asp-102, и между ними реализуется взаимодействие N^{δ1}—H...O^{δ2}.

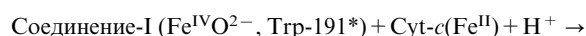
Вернемся теперь к работе²⁶¹, в которой изучен с помощью рентгеновской дифракции на синхротронном излучении, механизм действия трипсина на второй стадии каталитического акта (IV–VII). Исследование началось с приготовления устойчивого промежуточного соединения ферментативной реакции — ацилфермента (VI) — путем присоединения *n*-гуанидинбензоата (GB) к Ser-195 трипсина, находящегося в кристаллическом состоянии в маточном растворе с pH 5.5. При быстром повышении pH до 8.5 возник процесс, который контролировался методом трехмерной Лауэ-дифракции. Дифракция рентгеновских лучей фиксировалась при трех сериях облучений различных участков кристаллического образца с пятисекундной экспозицией одной съемки в каждой серии. Первая серия экспозиций (*t*₀) проведена до впрыскивания в проточную ячейку буферного раствора pH 8.5, а вторая и третья серии — спустя 3 и 90 мин соответственно (*t*₃, *t*₉₀). Пространственные структуры трех фермент-субстратных комплексов расшифрованы с разрешением 1.8 Å и *R*-факторами ~20%. Сопоставление структур до и после повышения pH показало, что одна из находящихся в активном центре фермента молекул воды предрасположена к атаке ацильной группы на стадии инициации гидролиза ацилфермента и по ходу реакции обнаруживает тенденцию к сближению с карбонильным углеродом. Таким образом, декларация об участии воды в процессе деацилирования трипсина интермедиата превращается из весьма вероятного предположения в экспериментальный факт.

3. Структура промежуточного соединения первой стадии реакции цитохром-с-пероксидазы с перекисью водорода

Согласно существующему представлению, цитохром-с-пероксидаза (CCP) катализирует восстановление перекисей по механизму, состоящему из следующих трех стадий:^{292–295}



→ Соединение-I (Fe^{IV}O²⁻, Trp-191*) + H₂O



→ Соединение-II (Fe^{IV}O²⁻) + Cyt-*c*(Fe^{III}) (2)

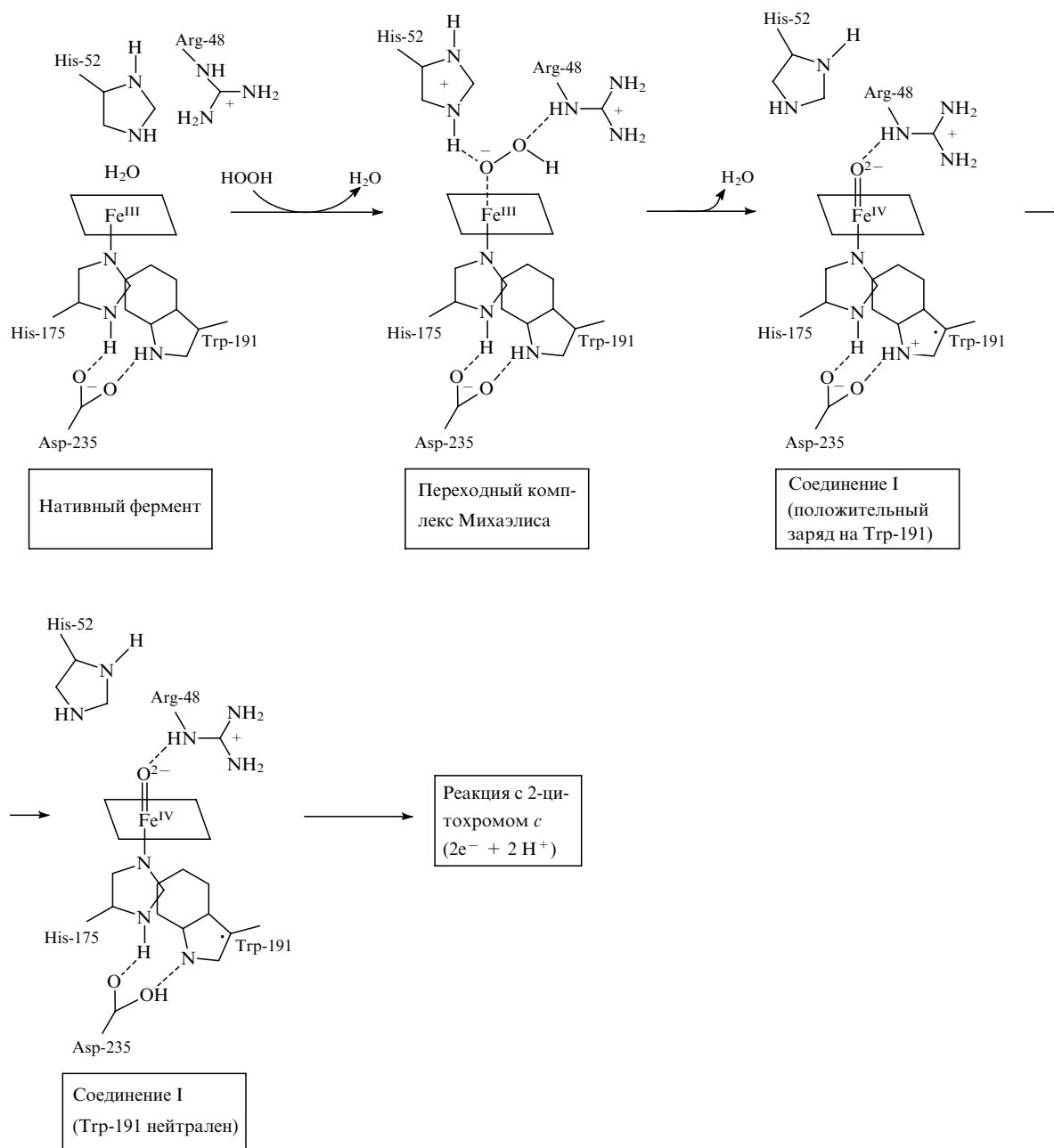


→ CCP(Fe^{III}) + Cyt-*c*(Fe^{III}) + H₂O

На первой стадии реакции цитохром-с-пероксидазы с перекисью водорода образуется дважды окисленный интермедиат, получивший название «соединение-I». В работе²⁵⁹ описаны трехмерные структуры нативного фермента и соединения-I и конформационные изменения CCP, происходящих при образовании интермедиата на первой стадии катализа.

Соединение-I получено в кристаллической форме из дрожжевой цитохром-с-пероксидазы при реагировании кристаллического фермента, помещенного в маточном растворе в проточную ячейку, с находящейся в маточном растворе перекисью водорода. Реакция между ферментом и H₂O₂, протекание которой регистрировалось с помощью спектров поглощения в видимой области (550–750 нм), почти полностью завершалась при 6°C через несколько минут. После этого концентрация образовавшегося соединения-I оставалась практически неизменной (90–95%) по крайней мере в течение 30 мин. Трехмерные структуры нативного фермента и его первого промежуточного производного расшифрованы методом трехмерной Лауэ-дифракции с разрешением 2.2 Å и *R*-факторами расходимости ~15.8% (см. табл. 8, № 3). Кристаллические образцы имели размеры 0.4 × 4.0 × 1.0 мм.

Схема 9



Использовалось полихроматическое синхротронное излучение; время одной экспозиции составляло ~ 0.3 с. Всего было сделано четыре серии независимых экспериментов на четырех кристаллах при четырех различных ориентациях образцов (четыре для нативного фермента и четыре для соединения-I).

При сопоставлении геометрии найденных структур авторы²⁵⁹ обнаружили изменения, вызванные переходом ССР в соединение-I. Они коснулись только области активного центра, причем главным образом его дистальной части (схема 9). В нативном состоянии фермента лиганд-связывающий карман над атомом железа заполнен тремя молекулами воды. При образовании фермент-субстратного комплекса две из них вытесняются, а третья немного смещается, но по-прежнему остается связанной с остатком Trp-51 и Fe-содержащей группой гема. После возникновения соединения-I и гетеролитического расщепления пероксидной связи атом субстратного кислорода связывается с железом, изменяя его окисное состояние от высокоспинового ферри- до низкоспинового ферро-состояния ($\text{Fe}^{\text{III}} \rightarrow \text{Fe}^{\text{IV}}$). Атом железа, обра-

зовав связь Fe—O длиной ~ 1.7 Å, перемещается на 0.3 Å от плоскости гема в направлении дистального His-52. Расположенная несколько в стороне боковая цепь Arg-47 смещается на 1.3 Å к ферро-кислородному атому и образует с ним водородную связь. Расстояния между ферро-кислородом и атомом N^ε остатка Arg-48 составляет 2.8 Å, атомом Ne1 остатка Trp-51 — 2.7 Å и атомом N^{ε2} His-52 — 3.6 Å, что слишком велико для водородной связи.

При образовании соединения-I индольное кольцо проксимального остатка Trp-191, отдавая электрон ферро-кислороду, окисляется. Возникший катион-радикал с зарядом на атоме индольного азота взаимодействует посредством водородной связи $\text{N}^+ - \text{H} \cdots \text{O}^{\delta 1}$ с кислородом заряженной карбоксильной группы боковой цепи Asp-235; второй кислород этого остатка ($\text{O}^{\delta 2}$) связан с группой N—H остатка His-175. Поскольку заметное изменение геометрии активного центра в этой области отсутствует, то высказанные соображения о распределении электронной плотности в проксимальных остатках представляют собой лишь одну из версий.

4. Фотолиз комплекса миоглобина с монооксидом углерода (Mb–CO)

Недавно были опубликованы два структурных исследования этого комплекса, которые в экспериментальном отношении можно считать вершинами современной белковой кристаллографии.^{296, 297} Обе работы посвящены изучению механизма фотодиссоциации ингибированного оксидом углерода миоглобина.



Цель обеих работ состояла в определении положения молекулы CO в переходном состоянии и выяснении реакции активного центра белка на разрыв связи Fe–O. Экспериментальное решение и той и другой задачи требовало установления трехмерной структуры короткоживущего интермедиата Mb* и сопоставления со структурами нативного миоглобина и его ингибиторного комплекса.

Авторы работы²⁹⁶ в качестве объекта исследования выбрали мутантный миоглобин, образующий гексагональную решетку. Образец охлаждали до ~20 K и облучали для инициации и поддержания фотолиза видимым светом от обычного источника; рентгенодифракционную картину получали с использованием синхротронного излучения (рис. 21). По аналогичной схеме строился и другой эксперимент.²⁹⁷ Различия заключались в использовании в последнем случае нативного миоглобина (из спермы кита), кристаллы которого имеют не гексагональную решетку, а моноклинную; образец охлаждали до температуры ~40 K и облучали мощным лазерным источником света.

Результаты обоих исследований, за исключением некоторых количественных расхождений в оценке конформационных изменений активного центра миоглобина, совпали. В том и другом случаях найдено, что при фотодиссоциации комплекса молекула CO удаляется от атома Fe, но остается в активном центре и располагается параллельно плоскости группы гема на расстоянии ~3.6 Å. Атом Fe одновременно смещается в ту же сторону на расстояние 0.2 Å (данные работы²⁹⁶). Помимо этого были отмечены изменения при фотолизе положений боковых цепей дистальных His, Arg и проксимального His, а также α-спирали F. В работе²⁹⁷ таких наблюдений не отмечено, что, по-видимому, нельзя объяснить разной упаковкой кристаллов нативного и мутантного миоглобина. Ранее было показано, что мутация образца, использованного в работе²⁹⁶, не вызывает конформационных изменений в трехмерной структуре белка и не влияет на его физиологические свойства.²⁹⁹ Отмеченные структурные изменения при фотолизе согласуются со спектральными

данными^{300, 301} и результатами расчета молекулярной динамики.^{302, 303}

В этом разделе были рассмотрены результаты опубликованных к концу 1994 г. рентгеноструктурных исследований механизма функционирования белков, выполненных с привлечением синхротронного излучения. Таких работ пока немного, но, бесспорно, именно они отражают принципиальную тенденцию развития метода. Если всего лишь несколько лет назад его задача могла формулироваться только как изучение трехмерных структур белковых молекул и их стабильных комплексов, то теперь доступными для исследования на том же атомном уровне становятся трехмерные структуры промежуточных соединений. Таким образом, рентгеноструктурный анализ перешел от изучения молекулярной морфологии начальных и конечных продуктов физиологических реакций к молекулярной морфологии интермедиатов. Это событие знаменует собой скачок в развитии метода, качественное изменение его возможностей в решении огромного числа новых задач молекулярной биологии.

VIII. Многоволновая аномальная дифракция

Самой сложной проблемой рентгеновской кристаллографии, безусловно, является фазовая проблема. Именно она сдерживала расшифровку картин дифракции и установление трехмерных молекулярных структур.

В случае белков решение фазовой проблемы было найдено введением в рентгеноструктурный анализ изоморфных производных — невалентных комплексов белка с тяжелыми атомами (Au, Pb, Hg, Ag, Tl и др.), присоединение которых не должно искажать пространственного строения белковой молекулы и кристаллической решетки. Различие интенсивностей дифрагированных пучков кристаллами нативного белка и его производных можно использовать для определения фаз, если предварительно установить положения тяжелых атомов. Существует несколько различных способов решения этой задачи.^{5, 304}

Метод определения фаз с помощью тяжелых атомов, получивший название мультиплетного изоморфного замещения (МИЗ), впервые был опробован в 1954 г. в исследовании кристаллической структуры гемоглобина.³⁰⁵ С тех пор и почти до самого последнего времени он оставался практически единственным подходом к расчету требуемых фазовых углов. Все эти годы, однако, не прекращался поиск альтернативного подхода, поскольку метод МИЗ весьма далек от совершенства.

Другое решение фазовой проблемы оказалось возможным с использованием эффекта аномального рассеяния рентгеновских лучей. Классическая теория этого явления была развита еще в 1933 г. Хенлом.³⁰⁶

В соответствии с теорией дифракции атомная амплитуда рассеяния f является комплексной величиной и записывается как

$$f = f^0 + f^{\Delta} e^{ik} = f^0 + f' + f''$$

где f^0 — амплитуда упругого «нормального» рассеяния, а $f^{\Delta} e^{ik}$ — «аномальная» поправка, записываемая как сумма действительной дисперсионной (f') и мнимой абсорбционной (f'') частей. Поправка f^{Δ} сильно зависит от длины волны излучения λ , в то время как обычная амплитуда рассеяния (f) в основном является функцией брэгговского угла рассеяния θ .

Абсолютная величина f'' пропорциональна коэффициенту поглощения. Поэтому она приобретает большое значение, когда частота рентгеновского кванта близка к краю поглощения атома.

Кристаллы соединений, не содержащие каких-либо аномальных центров, нормально рассеивают рентгеновские лучи. Аномальное рассеяние в этом случае отсутствует, так как частоты собственных колебаний атомов H, C, N, O и S

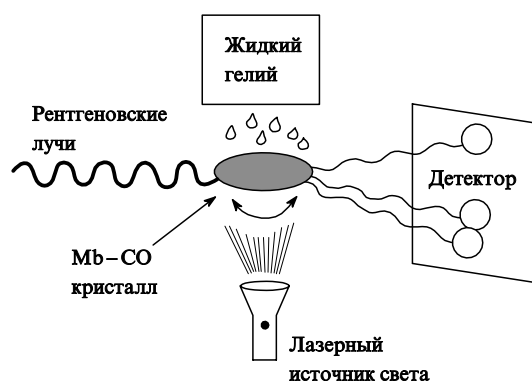


Рис. 21. Схема экспериментальной установки для получения рентгеновской дифракции кристаллами Mb–CO в процессе фотолиза^{296–298}

весьма далеки от частоты К-излучения для возникновения резонанса. Общая дифракция кристалла (в том числе белкового), обладающего аномально рассеивающими центрами, описывается для каждого измеренного отражения структурным фактором $^{\lambda}F_T$. Он включает нормальную часть, 0F_T , состоящую из рассеивающих компонент от всех атомов структуры белка, и аномальную часть. Последняя равна произведению нормальных компонент аномально рассеивающих центров, 0F_A , на отношение факторов аномального рассеяния к нормальному, $f^A(\lambda)/f^0(\theta)$. Следовательно,

$$^{\lambda}F_T = ^0F_T + ^0F_A \cdot f^A(\lambda)/f^0(\theta).$$

Карле в 1980 г.³⁰⁷ и позднее Хендриконом³⁰⁸ было показано, что прецизионные измерения интенсивностей всех дифракционных отражений от одного кристаллического белкового образца с аномальным рассеянием, полученных при нескольких (3–5) длинах волн рентгеновского излучения, позволяют по набору экспериментальных данных (I) рассчитать вещественные составляющие факторов $|^0F_T|$, $|^0F_A|$ и $\Delta\Phi^0 = \Phi_T^0 - \Phi_A^0$. Далее, значения $|^0F_A|$ используют для определения пространственного расположения центров аномального рассеяния, а на этой основе рассчитывают сначала значения Φ_A^0 , а затем, зная $\Delta\Phi^0$, значения Φ_T^0 .

Таким образом, фазовая проблема может быть решена и без привлечения метода мультиплетного изоморфного замещения. Однако цена такого решения долгое время оставалась слишком обременительной, и при этом требовалось соблюдение, по крайней мере, двух достаточно трудновыполнимых условий. Во-первых, исследуемый образец должен содержать аномально рассеивающие атомы, которых в нативном белке может не оказаться. Во-вторых, для оптимизации эффекта аномального рассеяния необходим источник рентгеновского излучения, каковым является излучение синхротрона, непрерывно настраиваемый на разные длины волн с высокой точностью и в широком спектральном диапазоне. В настоящее время отмеченные трудности метода многоволновой аномальной дифракции (МАД) в основном преодолены, и решающую роль начинают играть его очевидные преимущества перед традиционным подходом к решению фазовой проблемы (МИЗ).

В первый раз монополия в рентгеновской кристаллографии белков метода изоморфного замещения была нарушена в 1981 г.,³⁰⁹ когда удалось установить атомную трехмерную структуру крамбина по дифракционной картине одного кристаллического образца. Проблема фаз была решена методом МАД при использовании трех длин волн синхротронного излучения и аномального рассеяния атомов серы остатков метионина, входящих в аминокислотную последовательность белка. Стало очевидно, что синхротронная радиация может сделать МАД мощным инструментом исследования структуры белков. Не в полной мере, однако, удовлетворяло использование серы в качестве аномально рассеивающего центра. Дисперсионный f' и абсорбционный f'' компоненты фактора аномального рассеяния этого атома значительно уступают величине нормального компонента структурного фактора и во много раз меньше соответствующих величин компонентов аномального рассеяния более тяжелых атомов. Поэтому в последующем рентгеноструктурном анализе белков с помощью МАД от использования серы как аномально рассеивающего атома пришлось отказаться. Объектами исследования стали белки, содержащие в нативном состоянии атомы металлов (Fe, Zn, Cu и др.), и изоморфные тяжелоатомные производные белков, как в методе МИЗ. Вслед за крамбином, используя аномальное рассеяние, были расшифрованы структуры парвальбумина,³¹⁰ цитохрома- c' ,³¹¹ азурина,³¹² гемоглобина,^{313, 314} ферроксина,³¹⁴ селенолантионина³¹⁵ и селенобиотинилстрептавидина³¹⁴.

Приобретенный опыт работы с МАД позволил усовершенствовать многие экспериментальные и математические

процедуры резонансного метода,³¹⁶ и в результате фазы стали рассчитываться с помощью МАД столь же точно, как и при мультиплетном изоморфном замещении. Решение на основе эффекта аномального рассеяния проблемы фаз приобрело универсальную форму, приложимую к любым кристаллическим белковым образцам, содержащим аномально рассеивающие центры. Также общий характер имеет способ введения в белки необходимых при использовании МАД дифракционных меток.³¹⁷

Точность результатов рентгеноструктурного анализа с МАД, как и МИЗ, очевидно, будет тем выше, чем совершеннее изоморфизм у производных белка с резонансными центрами в первом случае и тяжелыми атомами во втором. Ситуация в этом отношении более предпочтительна при аномальном рассеянии, поскольку здесь все необходимые для установления трехмерной структуры белковой молекулы данные можно получить при облучении несколькими длинами волн одного кристалла. Для реализации этого преимущества был необходим метод, который гарантировал бы сведение к минимуму вероятность нарушения изоморфизма при использовании *in situ* резонансных меток, был бы достаточно прост и мог бы применяться в рентгеноструктурном анализе любых белков. Весьма близок к удовлетворению этих требований метод приготовления селенометиониновых белковых препаратов, дающих аномальное рассеяние.³¹⁷

Еще в 1957 г. было обнаружено, что ауксотрофные клетки *E.coli*, утратившие способность синтезировать метионин, могут успешно развиваться и давать не менее ста поколений при добавлении в питательную среду селенометионина.³¹⁸ Тем самым было показано, что необходимые для поддержания жизни *E.coli* белки, в которых все остатки Met заменены на Se-Met, продолжают функционировать нормально. Позже эти результаты были подтверждены целенаправленным созданием ауксотрофного для метионина клона путем повреждения MetA-гена.³¹⁹ Появилась возможность производить синтез аминокислотных последовательностей *E.coli*, в которых на всех местах, где положено быть остаткам Met, находятся остатки Se-Met. Развивая это направление, Хендриксон и сотр.³¹⁷ разработали метод встраивания остатков Se-Met в рекомбинантные белки, продуцируемые плазмидами *E.coli*. Предшествующие исследования авторов пространственного строения молекул селенолантионина³¹⁵ и селенобиотинилстрептавидина³¹⁴ с определением фаз методом МАД показали, что атом Se является весьма эффективным центром аномального рассеяния. Поэтому можно полагать, что предложенный метод встраивания остатков селенометионина в положения метионина станет универсальным подходом для белков, особенно тех, которые не содержат в нативном состоянии естественных резонаторов.

Авторы метода использовали его для получения двух тиоредоксинов клеток T4 и *E.coli* со стопроцентной заменой метионина на селенометионин. Кристаллы [Se-Met]-замещенных тиоредоксинов оказались полностью изоморфными кристаллами природных рекомбинантных белков. Дифракционные измерения выполнены при трех выбранных длинах волн синхротронного излучения. Одна длина волны соответствовала минимуму аномального рассеяния ($f'_{\min}$), вторая максимальной энергии поглощения ($f''_{\max}$), а третья длина волны находилась вдали от полосы электронного перехода атома Se и, следовательно, отвечала фактору нормального рассеяния (f^0). На рис. 22 приведены зависимости факторов аномального рассеяния f' и f'' от облучающей длины волны, полученные при одной ориентации кристалла [Se-Met]-тиоредоксина *E.coli*. Высокая чувствительность f' и f'' к изменению длины волны в области 0.98 Å и четко выраженный крайевой эффект указывают на большие возможности метода МАД в решении фазовой проблемы: первоначально фазы находятся для нескольких аномально рассеивающих центров, а затем, на этой основе, для всех неводородных атомов

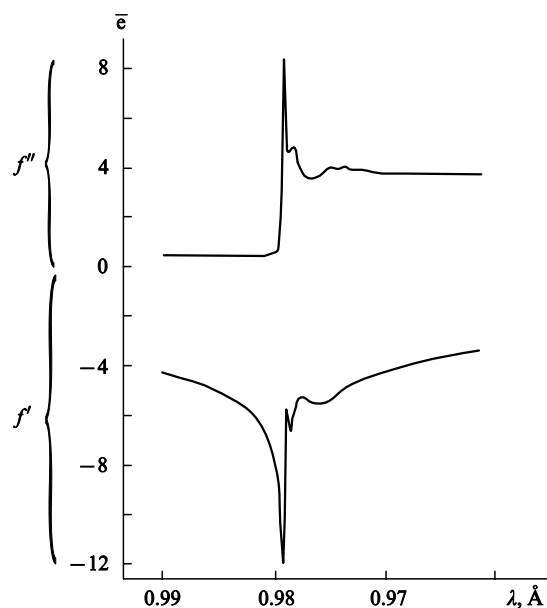


Рис. 22. Факторы аномального рассеяния f' , f'' кристаллов селенометионинового тиоредексина *E.coli*, измеренные вблизи края поглощения селена

белка (подробно см.³²⁰).

Таким образом, к началу 90-х годов внутренние проблемы метода многоволновой аномальной дифракции были в основном решены.

Быстрое признание нашел метод получения селенометионинных производных белков Хендриксона. В работах последних лет кристаллы таких белков часто служат для получения дифракционных картин одновременно и от аномального (используя при этом резонансные длины волн), и от нормального рассеяния (рассматривая селен как тяжелый атом). Именно такой является работа²⁷³, в которой определена с разрешением 2.5 Å трехмерная структура глобулярного домена линкерного гистона H5. [Se-Met]-Производное домена синтезировано методами генной инженерии. Выраженные из него кристаллы полностью изоморфны кристаллам нативного белка. Для определения фаз применены методы МАД и МИЗ. Авторы отметили, что обработка данных, выполненная традиционным способом в комбинации с недавно предложенной процедурой уточнения параметров тяжелых атомов, названной методом максимальной энтропии или максимального подобия,^{321, 322} привела к несколько более предпочтительным картам электронной плотности, чем способ, получивший название алгебраического метода.³¹⁶

Авторы работы³²³ установили с разрешением 1.95 Å кристаллическую структуру рестрикционной эндонуклеазы Bam HI, состоящей из 213 аминокислотных остатков. Авторы обратились к использованию селенометионинового варианта после того, как безрезультатными оказались попытки интерпретировать карту Паттерсона, которая была построена по данным, измеренным для нескольких белковых производных тяжелых атомов. [Se-Met]-Эндонуклеаза экспрессирована в ауксотрофных клетках *E.coli*, выращенных в среде, включающей наряду с 19 стандартными аминокислотами селенометионин вместо метионина.³¹⁷ Полученный таким образом объект исследования не отличался своей активностью от нативного фермента, а его кристаллы были полностью изоморфны кристаллическому состоянию последнего. Новизна этой работы состоит в том, что установление пространственной структуры эндону-

клеазы осуществлено путем комбинации фазовой информации, заключенной в данных аномальной дифракции, полученной методом максимальной энтропии и алгебраическим методом.^{316, 321, 322} И тот и другой приводят приблизительно к одинаковым фазовым ошибкам по отношению к фазам уточненной модели. Авторы полагают, что усредненные фазы значительно ближе к истине, чем полученные одним из методов. Кристаллы [Se-Met]-BamHI при температуре 5°C облучались тремя длинами волн, отвечающих краю (0.979 Å), пику (0.978 Å) поглощения Se и удаленной области спектра (0.900 Å).

Гонадотропин зародыша человека, структура которого была описана в работе³²⁴, является гликопротеиновым гормоном плаценты (237 аминокислотных остатков), стимулирующим секрецию поддерживающего беременность стероидного прогестерона. Как рекомбинантный [Se-Met]-белок, он был синтезирован в клетках яичника хомяка. Этот несколько неожиданный факт свидетельствует, что эукариотические клетки млекопитающих могут быть столь же высоко толерантны, как и прокариотические клетки *E.coli* к полному замещению метионина на селенометионин. Уровень замещения в данной работе составил 92%. Структура гонадотропина после частичного дегликозилирования идентифицирована с разрешением 2.6 Å. Использовались дифракционные данные, полученные методом МАД. Кристаллический образец облучался четырьмя длинами волн синхротронной радиации. Две из них (~0.98 Å) находились на краю и пике поглощения Se, а две другие в стороне от полосы поглощения. Для каждой длины волны были получены ориентировочные значения f' и f'' компонент аномального рассеяния.

В работе²⁷⁶ метод МАД использован для определения пространственной структуры регуляторного аллостерического фермента, глутамин-5-фосфорибозил-1-пирофосфат (PRPP)-амидотрансферазы. Белок состоит из 465 аминокислотных остатков и атома Fe, который является аномально рассеивающим центром при облучении тремя длинами волн (1.7425, 1.7390, 1.5000 Å) синхронного излучения. В кристалле PRPP-амидотрансфераза обнаружена в виде гомотетрамера молекулярной массы ~200 кДа. В предшествующих рентгеноструктурных анализах с применением метода аномальной дифракции объектами исследования были белки, молекулярные массы которых не превышали 30 кДа. Данная работа свидетельствует о больших возможностях МАД в определении трехмерных структур громоздких белковых комплексов.

IX. Заключение

Рассмотренные исследования, по-видимому, не оставляют сомнений в том, что в 90-е годы рентгеноструктурный анализ белков, по-прежнему сохраняя высокий темп экстенсивного развития, приступил к решению новых задач, представляющих первостепенный интерес для молекулярной биологии. Основная причина наметившегося качественного изменения возможностей кристаллографии макромолекул связана с использованием синхротронного излучения и новых методов регистрации дифракционной картины. Переход к новому источнику рентгеновского излучения, во-первых, ослабляет требования, предъявляемые к размерам кристаллов, что особенно важно в структурном анализе высокомолекулярных белков и их комплексов, имеющих крупные элементарные ячейки. Во-вторых, сплошной спектр синхротронной радиации и легкость выбора любой длины волны монохроматического излучения дали возможность по-новому подойти к решению фазовой проблемы и разработать метод многоволновой аномальной дифракции, требующий для определения лишь фаз одного кристаллического образца. Существенным дополнением метода МАД стал способ рекомбинантного получения в ауксотрофных клетках белков, в аминокислотных последовательностях которых все

остатки метионина заменены на селенометионин. Использование [Se-Met]-белков не только освобождает рентгеноструктурный анализ от длительной рутинной процедуры приготовления нескольких изоморфных белковых производных тяжелых атомов, но практически снимает саму проблему изоморфизма.

И наконец, самое важное — применение в кристаллографии белков синхротронной радиации и новых координатных детекторов снижает по крайней мере на два-три порядка время экспозиции. Значение этого факта трудно переоценить, так как доступными для установления трехмерных структур на атомном уровне становятся промежуточные соединения процессов жизнедеятельности. Если до недавнего времени рентгеноструктурный анализ являлся фактически единственным прямым методом исследования нативных конформаций белковых молекул с атомным разрешением, то сейчас, буквально на наших глазах, он становится источником (также единственным) столь же детальной информации о пространственном строении интермедиатов.

Литература

1. H.W.Wyckoff, K.D.Hardman, N.M.Allewell, T.Inagami, D.Tsernoglou, L.N.Honson, F.M.Richards. *J. Biol. Chem.*, **242**, 3749 (1967)
2. G.Kartha, J.Bello, D.Harker. *Nature (London)*, **213**, 862 (1967)
3. B.W.Matthews, B.Sigler, R.Henderson, D.M.Blow. *Nature (London)*, **214**, 652 (1967)
4. G.N.Reeke, J.A.Hurtsuck, M.L.Ludwig, W.N.Lipscomb. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **58**, 2220 (1967)
5. Т.Бландел, Л.Джонсон. *Кристаллография белка*. Мир, Москва, 1979
6. *Protein Data Bank, Int. Union Systr. Quarterly Newsletter*, **1**, 67 (1994)
7. J.C.Boyington, B.J.Gaffney, L.M.Amzel. *Science*, **260**, 1482 (1993)
8. A.Helenius, K.Simons. *Biochim. Biophys. Acta*, **415**, 29 (1975)
9. R.Henderson, N.T.Unwin. *Nature (London)*, **257**, 28 (1975)
10. J.Deisenhofer, O.Epp, K.Miki, R.Huber, H.Michel. *J. Mol. Biol.*, **180**, 385 (1984)
11. J.Allen, G.Feher, T.Yeats, H.Komiyama, D.C.Rees. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 5370 (1987)
12. M.S.Weiss, A.Kreusch, E.Schiltz, U.Nestel, W.Welte, J.Weckesser, G.E.Schulz. *FEBS Lett.*, **280**, 379 (1991)
13. A.M.de Vas, M.Ultsch, A.A.Kossiakoff. *Science*, **255**, 306 (1992)
14. M.V.Milburn, G.G.Prive, D.L.Milligan, W.K.Herber, P.L.Darke, N.E.Kohl, A.F.Dixon. *Science*, **252**, 1342 (1991)
15. A.F.Russo, D.E.Koshland. *Science*, **220**, 1016 (1983)
16. A.Krikos, N.Mutoh, A.Boyd, K.Kendall, M.I.Simon. *Cell*, **33**, 615 (1983)
17. J.Jancarik, W.G.Scott, D.L.Milligan, D.E.Koshland, S.-H.Kim. *J. Mol. Biol.*, **221**, 31 (1991)
18. W.L.Smith, P.Borgeat, F.A.Fitzpatrick. In *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*. (Eds D.F.Vance, J.Vance). Elsevier, New York, 1991. P.297
19. I.J.Marnett. *Environ. High Perspect.*, **88**, 5 (1990)
20. A.N.Makheja. *Mol. Cell. Biochem.*, **111**, 137 (1992)
21. S.Abramson. *Curr. Opin. Rheumatol.*, **3**, 336 (1991)
22. D.Picot, J.Loll, R.M.Garavito. *Nature (London)*, **367**, 243 (1994)
23. G.Blobel. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 1496 (1980)
24. M.F.Greaves, J.J.Owen, M.C.Raff. *Tu B Lymphocytes: Origins, Properties and Roles in Immune Responses*. Excerpta Medica, Amsterdam, 1973
25. Б.Албертс, Д.Брей, Дж.Льюис, М.Рэфф, К.Робертс, Дж.Уотсон. *Молекулярная биология клетки. Т. 5*. Мир, Москва, 1987.
26. F.M.Burnet. *The Clonal Selection Theory of Acquired Immunity*. Vanderbilt University Press, Nashville, TN, 1959
27. B.E.Biere, B.Sleekman, S.E.Ratnoffsky, S.J.Burakoff. *Annu. Rev. Immunol.*, **7**, 579 (1989)
28. H.Cantor, R.K.Gershon. *Fed. Proc.*, **38**, 2058 (1979)
29. R.M.Zinkernagel. *Hosp. Pract.*, **13**, 83 (1978)
30. R.Billingham, W.Silvers. *The Immunobiology of Transplantation. Foundations of Immunology Ser.* Prentice-Hall, Englewood Cliffs, NJ, 1971
31. J.L.Strominger. In *Immunobiology*. (Ed. M.E.Dorf). Garland STPM, New York, 1981. P.115
32. R.M.Zinkernagel, C.Doherty. *Adv. Immunol.*, **27**, 51 (1979)
33. I.Roitt. In *Essential Immunology*. Blackwell, Oxford, 1980
34. F.Ramsdell, B.J.Fowlkes. *J. Immunol.*, **143**, 1467 (1989)
35. J.C.Zuniga-Pflucker, L.A.Jones, D.L.Longo, A.M.Kruisbeek. *J. Exp. Med.*, **171**, 427 (1990)
36. W.Fung-Leung, M.W.Schilham, A.Rahemtulla, T.M.Kundig, M.Vollenweider, J.Potter, M.Swijk, T.Mak. *Cell*, **65**, 443 (1991)
37. S.L.Swain. *Immunol. Rev.*, **74**, 129 (1983)
38. Z.Dembic, W.Haas, R.Zamoyska, J.Parnes, M.Steinmetz, H.Boehmer. *Nature (London)*, **326**, 510 (1987)
39. J.Gabert, C.Langlet, R.Zamoyska, J.Parnes, A.Schmitt-Verhulst, B.Malissen. *Cell*, **50**, 545 (1987)
40. A.M.Normant, D.R.Littman. *EMBO J.*, **7**, 3433 (1988)
41. Y.Rosenstein, S.Ratnoffsky, S.J.Burakoff, S.H.Herrmann. *J. Exp. Med.*, **169**, 149 (1989)
42. R.D.Salter, R.J.Benjamin, K.Wesley. *Nature (London)*, **345**, 41 (1990)
43. S.K.Sanders, R.O.Fox, P.Kavathas. *J. Exp. Med.*, **174**, 371 (1991)
44. A.Veillette, M.A.Bookman, E.M.Horak, J.B.Bolen. *Cell*, **55**, 301 (1988)
45. D.R.Littman, Y.Thomas, P.Maddon, L.Chess, R.Axel. *Cell*, **40**, 237 (1985)
46. A.M.Normant, D.R.Littman. *EMBO J.*, **7**, 3433 (1988)
47. D.J.Leahy, R.Axel, W.A.Hendrickson. *Cell*, **68**, 1145 (1992)
48. J.Bjorkman, M.A.Saper, B.Samraoui, W.S.Bennett, J.L.Strominger, D.C.Wiley. *Nature (London)*, **329**, 506 (1987)
49. R.D.Salter, R.J.Benjamin, K.Wesley, S.E.Buxton, T.P.J.Garrett, C.Clayberger, A.M.Krensky, A.M.Normen, D.K.Littman, P.Parham. *Nature (London)*, **345**, 41 (1990)
50. J.H.Brown, T.Jardetsky, M.A.Saper, B.Samraoui, P.J.Bjorkman, D.C.Wiley. *Nature (London)*, **332**, 845 (1988)
51. G.Lange, S.J.Lewis, G.N.Murshudov, G.G.Dodson, P.C.Moody, J.P.Turkenburg, A.N.Barklay, R.L.Brady. *Structure*, **2**, 469 (1994)
52. J.Wang, J.Liu, D.W.Rodgers, R.L.Garlick, G.E.Torr, Y.Husain, E.L.Reinherz, S.L.Harrison. *Nature (London)*, **338**, 411 (1990)
53. T.J.Garrett, J.Wang, Y.Yan, J.Liu. *J. Mol. Biol.*, **234**, 763 (1993)
54. R.L.Brady, D.G.Lange, S.J.Davis, A.F.Williams, A.N.Barklay. *Science*, **260**, 979 (1993)
55. G.Cammarota, A.Scherle, B.Takas, D.M.Doran, R.Knorr, W.Bannwarth, J.Guardiola, F.Sinegaglia. *Nature (London)*, **356**, 799 (1992)
56. T.A.Potter, T.V.Rajan, R.F.Dick, J.A.Bluestone. *Nature (London)*, **337**, 73 (1989)
57. Y.Rosenstein, S.Ratnoffsky, S.J.Burakoff, S.H.Herrmann. *J. Exp. Med.*, **169**, 149 (1989)
58. J.Maddon, D.R.Littman, M.Godfrey, D.E.Maddon, L.Chess, R.Axel. *Cell*, **42**, 93 (1985)
59. D.J.Capon, S.A.Marsters, T.Gregory, H.Mitsuya, R.A.Birn, C.Lucas, F.M.Wurm, J.E.Groopman, S.Broder, D.H.Smith. *Nature (London)*, **337**, 525 (1989)
60. D.Klatzmann, D.H.Crawford, M.F.Greaves, R.Weiss. *Nature (London)*, **312**, 767 (1984)
61. A.G.Dalglish, C.L.Beverley, R.Clapham, D.H.Crawford, M.F.Greaves, R.A.Weiss. *Nature (London)*, **312**, 763 (1984)
62. A.F.Williams, S.J.Davis, Q.He, A.N.Barklay. *Cold Spring Harbor Sym Quant. Biol.*, **54**, 637 (1989)
63. D.Kwong, S.-E. Ryu, W.A.Hendrickson, R.Axel, R.M.Sweet, G.Folena-Wasserman, P.Hensley, R.W.Sweet. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 6423 (1990)
64. S.J.Davis, H.A.Ward, M.J.Puklavec, A.C.Willis, A.F.Williams, A.N.Barklay. *J. Biol. Chem.*, **265**, 10410 (1990)
65. D.F.Hunt, J.Shabanowitz, A.L.Cox, K.Sakaguchi, E.Appella, H.M.Grey, A.Sette. *Science*, **256**, 1817 (1992)
66. R.M.Chicz. *J. Exp. Med.*, **178**, 27 (1993)
67. J.L.Tiwari, P.I.Terasaki. *HLA and Disease Associations*. Springer, New York, 1985

68. J.A.Todd, H.Acha-Orbea, J.I.Bell, N.Chao, Z.Fronek, C.O.Jacob, H.O.McDevitt. *Science*, **240**, 1003 (1988)
69. J.C.Gorga, J.H.Brown, T.Jardetzky, D.C.Wiley, J.L.Strominger. *Res. Immunol.*, **142**, 401 (1991)
70. J.H.Brown, T.Jardetzky, C.Gorga, L.J.Stern, R.G.Urban, J.L.Strominger, D.C.Wiley. *Nature (London)*, **364**, 33 (1993)
71. J.Bjorkman, W.C.Bennett, J.L.Strominger, D.C.Wiley. *Nature (London)*, **329**, 506 (1987)
72. J.H.Brown, T.Jardetzky, M.A.Saper, B.Samranoui, P.J.Bjorkman, D.C.Wiley. *Nature (London)*, **332**, 845 (1988)
73. R.Konig, L.-Y.Huang, R.N.Germain. *Nature (London)*, **356**, 796 (1992)
74. L.Jorgensen, A.Reay, E.W.Ehrich, M.M.Davis. *Annu. Rev. Immunol.*, **10**, 835 (1992)
75. R.N.Germain, D.H.Margulies. *Annu. Rev. Immunol.*, **11**, 403 (1993)
76. K.Falk, O.Rotzschke, S.Stevanovic, G.Jung, H.-G.Rammensee. *Nature (London)*, **351**, 290 (1991)
77. D.F.Hunt. *Science*, **356**, 1261 (1992)
78. T.S.Jardetzky, W.S.Lane, R.A.Robinson, D.R.Madden, D.C.Wiley. *Nature (London)*, **353**, 326 (1991)
79. A.Y.Rudensky, P.Preston-Hurlburt, B.K.Al-Ramadi, J.Rothbard, C.A.J.Janeway. *Nature (London)*, **359**, 429 (1992)
80. R.M.Chicz, C.Gorga, L.J.Stern, D.A.A.Vignali, J.L.Strominger. *Nature (London)*, **358**, 764 (1992)
81. J.Hammer, D.Bolin, J.Higelin, B.Takacs, F.Sinigaglia. *Cell*, **74**, 197 (1993)
82. A.Sette. *J. Immunol.*, **151**, 3163 (1993)
83. D.R.Madden, J.C.Gorga, J.L.Strominger, D.C.Wiley. *Nature (London)*, **353**, 321 (1991)
84. D.R.Madden, J.C.Gorga, J.L.Strominger, D.C.Wiley. *Cell*, **70**, 1035 (1992)
85. M.L.Silver, H.-C.Guo, J.L.Strominger, D.C.Wiley. *Nature (London)*, **360**, 367 (1992)
86. D.R.Madden, D.N.Garbczi, D.C.Wiley. *Cell*, **75**, 693 (1993)
87. W.Zhang, A.C.M.Young, M.Imarai, R.G.Nanni, T.Li, G.F.Arnold, D.A.Oren, A.Jacobo-Molina, R.L.Williams, G.Kamer, D.A.Rubenstein, Y.Li, E.Rozhon, S.Cox, P.Buontempo. *J. Connell. Acad. Sci. US*, **89**, 8403 (1992)
88. A.C.M.Young, W.Zhang, J.C.Sacchettini, S.G.Nathanson. *Cell*, **76**, 39 (1994)
89. D.H.Fremont, M.Matsumura, E.A.Stura, P.A.Petersen, I.A.Wilson. *Science*, **257**, 919 (1992)
90. D.R.Madden, D.C.Wiley. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **2**, 300 (1992)
91. M.Matsumura, D.H.Fremont, A.Peterson, I.A.Wilson. *Science*, **257**, 927 (1992)
92. H.C.Guo, D.R.Madden, M.L.Silver, T.S.Jardetzky, J.C.Gorga, J.L.Strominger, D.C.Wiley. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 8053 (1993)
93. L.J.Stern, J.H.Brown, T.S.Jardetzky, J.C.Gorga, R.J.Urban, J.L.Strominger, D.C.Wiley. *Nature (London)*, **386**, 215 (1994)
94. N.S.Andreeva, A.E.Gustchina, A.A.Fedorov. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **95**, 23 (1977)
95. Н.С.Андреева, А.А.Федоров, А.Е.Гущина. *Молекуляр. биология*, **12**, 922 (1978)
96. Н.С.Андреева, А.С.Жданов, А.А.Федоров. *Молекуляр. биология*, **18**, 313 (1984)
97. A.R.Sielecki, A.A.Fedorov, A.Boothoo, N.S.Andreeva, M.N.J.James. *J. Mol. Biol.*, **214**, 148 (1990)
98. J.B.Cooper, G.Khan, G.Taylor, I.J.Tickle, T.L.Blundell. *J. Mol. Biol.*, **214**, 199 (1990)
99. N.S.Andreeva, A.S.Zdanov, A.E.Gustchina, A.A.Fedorov. *J. Biol. Chem.*, **259**, 11353 (1984)
100. M.H.G.James, A.R.Sielecki. *Nature (London)*, **319**, 33 (1986)
101. J.A.Hartsuck, S.J.Remington. In *Abstracts of the 18th Linderstrom-Lang Conference on Aspartic Proteinases*. Elsinore, 1988. P.40
102. М.Г.Сафро, Н.С.Андреева, А.С.Жданов. *Молекуляр. биология*, **19**, 400 (1985)
103. M.Newman, M.Safro, C.Fraza, G.Khan, A.Zdanov, I.J.Tickle, T.L.Blundell, N.S.Andreeva. *J. Mol. Biol.*, **221**, 1295 (1991)
104. G.L.Gilliland, E.L.Winborne, J.Nachman, A.Wlodawer. *Proteins*, **8**, 82 (1990)
105. A.R.Sielecki, E.Hayakawa, M.Fuginaga, M.E.P.Murphy, M.Fraser, A.K.Muir, C.T.Carilli, J.A.Lewicki, J.D.Buxter, M.N.G.James. *Science*, **241**, 1346 (1989)
106. J.Rahuel, J.Priestle, M.G.Grutter. *J. Struct. Biol.*, **107**, 227 (1991)
107. V.Dharanaj, C.G.Dealwis, C.Fraza, M.Badasso, B.L.Sibanda, I.J.Tickle, J.B.Cooper, H.P.C.Driessen, M.Newman, C.Aguilar, S.P.Wood, T.L.Blundell, P.M.Hobard, K.F.Geoghegan, M.J.Ammirati, D.E.Danley, B.A.O'Connor, D.J.Hoover. *Nature (London)*, **357**, 466 (1992)
108. C.G.Dealwis, C.Fraza, M.Badasso, J.B.Cooper, I.J.Tickle, H.Driessen, T.L.Blundell, K.Murukami, H.Mijazaki, J.Suerias-Diaz, D.M.Jones, M.Szelke. *J. Mol. Biol.*, **236**, 342 (1994)
109. F.Cumming, D.Le-Nguen, B.Castro, J.Menard, P.Carvol. *Biochim. Biophys. Acta*, **913**, 10 (1987)
110. I.N.Hsu, L.T.J.Delbaere, M.N.G.James, T.Hoffman. *Nature (London)*, **266**, 140 (1977)
111. M.N.G.James, A.R.Sielecki. *J. Mol. Biol.*, **163**, 229 (1983)
112. M.N.G.James, A.R.Sielecki. *Biochemistry*, **24**, 3701 (1985)
113. M.N.G.James, A.R.Sielecki, F.Saluturo, D.H.Rich, T.Hoffmann. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 6137 (1982)
114. M.N.G.James, A.R.Sielecki, T.Hoffmann. In *Aspartic Proteinases and their Inhibitors*. (Ed. V. Kostka). Walter de Gruyter, Berlin; New York, 1985. P.163
115. E.Subramanian, I.D.A.Swan, M.Li, D.R.Davies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 556 (1977)
116. Chi-h.Wong, T.J.Lee, T.-H.Lu. *Biochemistry*, **18**, 1638 (1979)
117. T.Blundell, A.Jenkins, B.T.Sewell, L.H.Pearl, J.B.Cooper, S.P.Wood, B.Veerapandian. *J. Mol. Biol.*, **211**, 919 (1990)
118. J.B.Cooper, S.Foundling, A.Hemminge, T.L.Blundell, D.M.Jones, A.Hallett, M.Szelke. *Eur. J. Biochem.*, **169**, 215 (1987)
119. A.Sali, B.Veerapandian, J.B.Cooper, S.I.Foundling, D.J.Hoover, T.L.Blundell. *EMBO J.*, **8**, 2179 (1989)
120. J.B.Cooper, S.Foundling, J.Boger, R.A.Jupp, J.Kay, T.L.Blundell. *Biochemistry*, **28**, 8596 (1989)
121. E.Subramanian, M.Lin, I.D.A.Swan, D.R.Davies. *Adv. Exp. Biol. Med.*, **95**, 33 (1977)
122. K.Suguna, R.R.Bott, E.A.Padlan, E.Subramanian, S.Sheriff, G.A.Cohan, D.K.Davies. *J. Mol. Biol.*, **196**, 877 (1987)
123. R.Bott, E.Subramanian, D.Davies. *Biochemistry*, **28**, 6956 (1982)
124. K.Suguna, E.A.Padlan, C.M.Smith, W.D.Carlson, D.R.Davies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 7009 (1987)
125. M.E.Fraser, K.Hayakawa, Y.Yoshinaka. *Viral Proteinases as Targets for Chemotherapy*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1989
126. M.Miller, M.Jaskolski, M.J.K.Rao, J.Leiss, A.Wlodawer. *Nature (London)*, **337**, 576 (1989)
127. M.A.Navia, M.D.Fitzgerald, B.M.McKeever, J.P.Springer, M.Poe, J.Bodger, K.Hoogsteen. *Nature (London)*, **337**, 615 (1989)
128. A.Wlodawer, M.Miller, M.Jaskolski, B.K.Sathyanarayana, E.Baldwin, I.T.Weber, I.M.Selk, I.Clawson, I.Schneider, S.B.H.Kent. *Science*, **245**, 616 (1989)
129. M.Jaskolski, A.G.Tomasselli, T.K.Sawer, D.S.Staples, R.L.Hendrikson, J.Sneider, S.B.H.Kent, A.Wlodawer. *Biochemistry*, **30**, 1600 (1991)
130. A.L.Swain, M.Miller, J.Green, D.H.Rich, J.Schneider, S.B.H.Kent, A.Wlodawer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 8805 (1990)
131. M.Miller, J.Schneider, B.K.Sathyanarayana, M.V.Toth, G.R.Marshall, L.Clawson, L.Selk, S.B.H.Kent, A.Wlodawer. *Science*, **246**, 1149 (1989)
132. T.N.Bhat, E.T.Baldwin, B.Liu, Y.S.Cheng, J.W.Erickson. *Nature Struct. Biol.*, **1**, 552 (1994)
133. A.Sali, B.Veerapandian, J.B.Cooper, D.S.Moss, T.Hofmann, T.L.Blundell. *Proteins*, **12**, 158 (1992)
134. V.K.Antonov, L.M.Ginodman, L.D.Rumsh. *Eur. J. Biochem.*, **117**, 195 (1981)
135. V.K.Antonov. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **95**, 179 (1977)
136. V.K.Antonov, L.M.Ginodman, Yu.V.Kapitannikov. *FEBS Lett.*, **88**, 87 (1978)
137. В.К.Антонов, Л.П.Явашев, Л.И.Волкова, В.Л.Садовская, Л.М.Гинодман. *Биооргани. химия*, **5**, 1427 (1979)
138. H.Mitzusuya, R.Yarchoan, S.H.Broder. *Science*, **249**, 1533 (1989)
139. A.G.Tomasselli, W.F.Hove, T.K.Sawyer, A.Wlodawer, R.L.Hendrikson. *Chim. Oggi*, **6** (1991)
140. N.E.Kohl, E.A.Emini, W.A.Schleif, L.J.Davis, J.C.Heimbach, R.A.F.Dixon, E.M.Scolnick, I.S.Sigal. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 4686 (1988)
141. J.R.Huff. *J. Med. Chem.*, **34**, 2305 (1991)

142. L.Pearl, W.Taylor. *Nature (London)*, **329**, 351 (1987)
143. Y.S.E.Cheng, F.H.Yin, S.Foundling, D.Blomstrom, C.A.Kettner. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 9660 (1990)
144. C.L.Dilanni, L.J.Davis, M.K.Holloway, W.K.Herber, P.L.Darke, N.E.Kohl, КюА.Ф.Диксон. *J. Biol. Chem.*, **265**, 17348 (1990)
145. S.Seelmeier, H.Schmidt, V.Turk, K.von der Helm. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 6612 (1988)
146. S.F.J.Le Grice, J.Mills, J.Mous. *EMBO J.*, **7**, 2547 (1988)
147. D.D.Leob, R.Swanstrom, L.Everitt, M.Manchester, S.E.Stamper, C.A.Hutchison. *Nature (London)*, **340**, 397 (1989)
148. X.Lin, R.N.S.Wong, J.Tang. *J. Biol. Chem.*, **264**, 4482 (1989)
149. L.M.Babe, S.Pichuanes, C.K.Craik. *Biochemistry*, **30**, 106 (1991)
150. R.H.Jacobson, X.-J.Zhang, R.F.Du Bose, B.W.Matthews. *Nature (London)*, **369**, 761 (1994)
151. C.G.Dealwis, C.Fraza, M.Badasso, J.B.Cooper, I.J.Tickle, H.Driessen, T.L.Blundell, K.Murukami, H.Miyazaki, D.Sneiras-Diaz, D.M.Jones, M.Szelke. *J. Mol. Biol.*, **236**, 342 (1994)
152. G.R.Delpierre, J.S.Fruton. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **54**, 1161 (1965)
153. M.N.G.James. *Can. J. Biochem.*, **58**, 3701 (1980)
154. M.N.G.James, I.N.Hsu, L.T.J.Delbaere. *Nature (London)*, **267**, 808 (1977)
155. J.S.Fruton. *Adv. Enzymol.*, **33**, 401 (1970)
156. T.L.Blundell, H.B.Jones, G.Rhan. *Proc. FEBS Meet.*, **60**, 281 (1980)
157. Н.С.Андреева, А.Е.Гущина, А.А.Федоров. *Докл. АН СССР*, **259**, 1284 (1981)
158. B.Foltmann. *Essays Biochem.*, **17**, 52 (1981)
159. L.Pearl. *FEBS Lett.*, **214**, 8 (1987)
160. W.Jenckes. *Adv. Enzymol.*, **43**, 219 (1975)
161. Е.М.Попов. *Структурно-функциональная организация белков*. Наука, Москва, 1992. С.358
162. Б.Албертс, Д.Брей, Дж.Льюис, М.Рэфф, К.Робертс, Дж.Уотсон. *Молекулярная биология клетки. Т.2*. Мир, Москва, 1986
163. R.D.Kornberg. *Science*, **184**, 868 (1974)
164. R.D.Kornberg, J.O.Thomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**, 2626 (1975)
165. R.T.Simpson. *Biochemistry*, **17**, 5524 (1978)
166. A.Klug, D.Rhodes, J.Smith, J.T.Finch, J.O.Thomas. *Nature (London)*, **287**, 508 (1980)
167. P.Oudet, M.Gross-Bellard, P.Chambon. *Cell*, **4**, 281 (1975)
168. F.Thoma, T.Koller, A.J.Klug. *J. Cell. Biol.*, **83**, 403 (1979)
169. I.Isenberg. *Annu. Rev. Biochem.*, **48**, 159 (1979)
170. J.Baldwin, G.Boseley, E.M.Bradbury, K.Ibel. *Nature (London)*, **253**, 245 (1975)
171. L.Perez-Grau, J.Bordas, M.N.J.Koch. *Nucleic Acids Res.*, **12**, 2987 (1984)
172. G.A.Bentley, A.Lewitt-Bentley, J.T.Finch, A.D.Podjarny. *J. Mol. Biol.*, **176**, 55 (1984)
173. J.T.Finch, L.C.Lutter, D.Rhodes, R.S.Brown, B.Rushton, M.Levitt, A.Klug. *Nature (London)*, **269**, 29 (1977)
174. J.T.Finch, R.S.Brown, D.Rhodes, T.Richmond, B.Rushton, L.C.Lutter, A.Klug. *J. Mol. Biol.*, **145**, 757 (1981)
175. T.J.Richmond, J.T.Finch, B.Rushton, D.Rhodes, A.K.Lug. *Nature (London)*, **311**, 532 (1984)
176. R.W.Burlingame, W.E.Love, E.N.Moudrianakis. *Science*, **223**, 413 (1984)
177. R.W.Burlingame, W.E.Love, Bi-Ch.Wang, R.Hamlin, N.H.Huong, E.N.Moudrianakis. *Science*, **228**, 546 (1984)
178. Bi-Ch.Wang, J.Rose, G.Arents, R.W.Burlingame. *J.Mol. Biol.*, **236**, 179 (1984)
179. G.Arents, R.W.Burlingame, Bi-Ch.Wang, E.N.Moudrianakis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 48, (1991)
180. J.C.Wang. *J. Mol. Biol.*, **55**, 523 (1971)
181. R.J.DiGate, K.Marians. *J. Biol. Chem.*, **264**, 17924 (1989)
182. J.W.Wallis, G.Chrebet, G.Estesky, M.Rolf, R.Rothstein. *Cell*, **58**, 409 (1989)
183. R.A.Kim, J.C.Wang. *J. Biol. Chem.*, **267**, 17178 (1992)
184. A.Kikuchi, K.Asai. *Nature (London)*, **309**, 677 (1984)
185. F.Confalonieri, C.Elie, M.Danal, C.B. de La Tour, P.Forterre, M.Duguet. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 4753 (1993)
186. A.Kornberg, T.Beker. *DNA Replication*. Freeman, New York, 1992
187. Ch. D.Lima, J.C.Wang, A.Mondragon. *Nature (London)*, **367**, 138 (1994)
188. V.-C.Tse-Dinh, R.K.Beran-Steez. *J. Biol. Chem.*, **263**, 15857 (1988)
189. R.Lynn, Wang. *Proteins*, **6**, 231 (1989)
190. J.C.Wang. *Sci. Am.*, **247**, 94 (1982)
191. C.D.Lima, J.C.Wang, A.Mondragon. *J. Mol. Biol.*, **232**, 1213 (1993)
192. Г.Шульд, Р.Ширмер. *Принципы структурной организации белков*. Мир, Москва, 1982
193. Б.Албертс, Д.Брей, Дж.Льюис, М.Рэфф, К.Робертс, Дж.Уотсон. *Молекулярная биология клетки. Т.1*. Мир, Москва, 1986
194. J.J.Champoux. *ШТDNA Topology and its Biological Effects*. (Eds N.R.Cozzarelli, J.C.Wang). Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1990. P.217
195. Е.М.Попов. *Молекуляр. биология*, **11** 5 (1977)
196. R.H.Jacobson, X.-J.Zhang, R.F.DuBose, B.W.Matthews. *Nature (London)*, **369**, 761 (1994)
197. M.Ring, R.E.Huber. *Arch. Biochem. Biophys.*, **283**, 342 (1990)
198. C.G.Cupples, J.H.Miller, R.E.Huber. *J. Biol. Chem.*, **265**, 5512 (1990)
199. R.D.Vale, L.S.B.Goldstein. *Cell*, **60**, 883 (1990)
200. H.E.Huxley. *Biochim. Biophys. Acta*, **12**, 387 (1953)
201. H.E.Huxley, J.Hanson. *Nature (London)*, **173**, 973 (1954)
202. V.A.Engelhardt, M.N.Ljubimova. *Nature (London)*, **144**, 663 (1939)
203. Б.Катц. *Нерв, мышца и синапс*. Мир, Москва, 1969
204. H.E.Huxley. *Science*, **164**, 1356 (1969)
205. H.E.Huxley. *Reflections on Muscle*. Princeton University Press, Princeton, New York, 1980
206. J.Squire. *The Structural Basis of Muscle Contraction*. Plenum, New York, 1981
207. R.Henderson, J.M.Baldwin, T.A.Ceska, F.Zemlin, E.Beckmann, K.H.Downing. *J. Mol. Biol.*, **213**, 899 (1990)
208. W.Kuhlbrandt, D.N.Wang, Y.Fugiyoshi. *Nature (London)*, **367**, 614 (1994)
209. K.C.Holmes. *Structure*, **2**, 589 (1994)
210. A.J.Fisher, J.E.Johnson. *Nature (London)*, **361**, 176 (1993)
211. R.H.Cheng, V.S.Reddy, N.H.Olson, A.J.Fisher, T.S.Baker, J.E.Johnson. *Structure*, **2**, 271 (1994)
212. G.Wang, C.Porta, Z.Chen, T.S.Baker, J.E.Johnson. *Nature (London)*, **355**, 275 (1992)
213. K.C.Holmes, D.Popp, W.Gebhard, W.Kabsch. *Nature (London)*, **347**, 44 (1990)
214. W.Kabsch, H.C.Mannherz, D.Suck, E.F.Pai, K.S.Holmes. *Nature (London)*, **347**, 37 (1990)
215. M.Lorenz, D.Popp, K.S.Holmes. *J. Mol. Biol.*, **234**, 826 (1993)
216. Е.М.Попов. *Структурная организация белков*, Наука, Москва, 1989
217. A.T.Brunger, M.Kuriyan, M.Karplus. *Science*, **235**, 458 (1987)
218. K.C.Holmes, M.Tirion, D.Popp, M.Lorenz, W.Kabsh, R.A.Milligan. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **332**, 15 (1993)
219. R.A.Milligan, M.Whittaker, D.Safer. *Nature (London)*, **348**, 217 (1990)
220. S.Lowey, H.S.Slayter, A.G.Weeds, H.Baker. *J. Mol. Biol.*, **42**, 1 (1969)
221. A.G.Weeds, S.Lowey. *J. Mol. Biol.*, **61**, 701 (1971)
222. S.S.Margossian, W.F.Stafford, S.Lowey. *Biochemistry*, **20**, 2151 (1981)
223. H.E.Huxley. *J. Mol. Biol.*, **7**, 281 (1963)
224. Б.Албертс, Д.Брей, Дж.Льюис, М.Рэфф, К.Робертс, Дж.Уотсон. *Молекулярная биология клетки. Т.3*. Мир, Москва, 1987
225. H.Muller, S.V.Perry. *Biochem. J.*, **85**, 431 (1962)
226. D.Wagner, E.Giniger. *Nature (London)*, **292**, 560 (1981)
227. S.Citi, J.Kendrick-Jones. *Bio Essays*, **7**, 155 (1987)
228. J.S.Sellers. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **1**, 98 (1991)
229. A.Elliott, G.Offer. *J. Mol. Biol.*, **123**, 505 (1978)
230. D.A.Winkelmann, H.Mekeel, I.Rayment. *J. Mol. Biol.*, **181**, 487 (1985)
231. D.A.Winkelmann, T.S.Baker, I.Rayment. *J. Cell Biol.*, **114**, 701 (1991)

232. I.Rayment, W.R.Rypniewski, K.Schmidt-Base, H.M.Holden. *Science*, **261**, 50 (1993)
233. H.W.White, I.Rayment. *Biochemistry*, **33**, 9859 (1993)
234. I.Rayment, H.M.Holden. *TIBS*, **19**, 129 (1994)
235. I.Rayment, H.M.Holden, M.Whittaker, C.B.Yohn, M.Lorenz, K.C.Holmes, R.A.Milligan. *Science*, **261**, 58 (1993)
236. F.F.Flicker, T.Wallimann, P.Vibert. *J. Mol. Biol.*, **169**, 723 (1983)
237. R.G.Yount, C.R.Cremo, J.C.Grammer, B.A.Kerwin. *Philos. Trans. R. Soc. London, B*, **336**, 55 (1992)
238. E.F.Pai, U.Krengel, G.A.Petsko, R.S.Goody, W.Kabsh, A.Wittinghofer. *EMBO J.*, **9**, 2351 (1990)
239. C.W.Muller, G.E.Schulz. *J. Mol. Biol.*, **224**, 159 (1992)
240. R.W.Lymn, E.W.Taylor. *Biochemistry*, **10**, 4617 (1971)
241. M.A.Geeves. *Biochem. J.*, **274**, 1 (1991)
242. E.W.Taylor. *CRC Crit. Rev. Biochem.*, **6**, 103 (1979)
243. M.G.Hibberd, D.R.Trentham. *Annu. Rev. Biophys. Biochem.*, **15**, 119 (1986)
244. I.Wakabayashi, M.Tokunaga, I.Kohno, Y.Sigimoto, T.Hamanaka, Y.Takesawa, T.Wakabayashi, Y.Amemiya. *Science*, **258**, 443 (1992)
245. K.A.Taylor, L.A.Amos. *J. Mol. Biol.*, **147**, 297 (1981)
246. J.A.Spodich. *Nature (London)*, **372**, 515 (1994)
247. K.M.Ruppel, T.Q.Uyeda, J.A.Spodich. *J. Biol. Chem.*, **269**, 18773 (1994)
248. J.T.Finer, R.M.Simmons, J.A.Spodich. *Nature (London)*, **368**, 113 (1994)
249. L.G.Parratt. *Rev. Sci. Instrum.*, **30**, 297 (1959)
250. R.Goodwin. *Springer Tracts Modern Phys.*, **51**, 1 (1969)
251. G.Rosenbaum, K.C.Holmes, J.Witz. *Nature (London)*, **230**, 434 (1971)
252. L.J.Barrington, G.Rosenbaum. *J. Appl. Crystallogr.*, **7**, 117 (1974)
253. Т.Д.Мокульская, М.А.Мокульский, А.А.Никитин. *Докл. АН СССР*, **218**, 824 (1974)
254. H.W.Wyckoff. In *Research Applications of Synchrotron Radiation*. (Eds R.W.Watson, M.L.Perlman). Publ. BNL 5038. Brookhaven National Laboratory, New York, 1973. P.133
255. S.C.Harrison. In *Research Applications of Synchrotron Radiation*. (Eds R.W.Watson, M.L.Perlman). Publ. BNL 5038. Brookhaven National Laboratory, New York, 1973. P.105
256. J.C.Phillips, A.Wlodawer, M.M.Yevitz, K.O.Hodgson. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**, 128 (1976)
257. S.J.Watowich, J.J.Skehel, D.C.Wiley. *Structure*, **2**, 719 (1994)
258. T.R.Schneider, K.S.Wilson. In *American Crystallography Association Annual Meeting, V.22*. Atlanta, GA, 1994. P.52
259. M.Fulop, R.Phizackerley, S.M.Soltis. *Structure*, **2**, 201 (1994)
260. M.Nikkola, Y.Lindqvist, G.Schneider. *J. Mol. Biol.*, **238**, 387 (1994)
261. T.Singer, A.Smalas, R.Carty, W.E.Mangel, R.M.Sweet. *Science*, **259**, 669 (1993)
262. R.H.Jacobson, X.-J.Zhang, R.F.Du Bose, B.W.Matthews. *Nature (London)*, **369**, 761 (1994)
263. J.John, S.J.Crennell, D.W.Hough, M.J.Dason, G.L.Taylor. *Structure*, **2**, 385 (1994)
264. C.G.Dealwis, C.Frazzao, M.Badasso. *J. Mol. Biol.*, **236**, 342 (1994)
265. K.H.G.Verschuere, F.Seljee, H.J.Rozeboom, K.H.Kalk, B.W.Dijkstra. *Nature (London)*, **363**, 693 (1993)
266. M.H.Ultsch, W.Somers, A.A.Kossiakoff, A.M.de Vos. *J. Mol. Biol.*, **236**, 286 (1994)
267. H.Lauble, M.C.Kennedy, H.Beinert, C.D.Stout. *J. Mol. Biol.*, **237**, 437 (1994)
268. Y.A.Muller, G.Schumacher, R.Rudolph, G.E.Schulz. *J. Mol. Biol.*, **237**, 315 (1994)
269. M.M.Teeter, S.M.Roc, N.H.Heo. *J. Mol. Biol.*, **230**, 292 (1993)
270. D.Housset, C.Habersetzer-Rochat, J.-P.Aster, J.C.Fontecilla-Camps. *J. Mol. Biol.*, **237**, 88 (1994)
271. F.R.Ahmed, D.R.Rose, S.V.Evans, M.E.Pippy, R.To. *J. Mol. Biol.*, **230**, 1216 (1993)
272. U.Schulze-Gahmen, J.M.Rini, L.A.Wilson. *J. Mol. Biol.*, **234**, 1098 (1993)
273. V.Ramakrishnan, J.T.Finch, V.Graziano, P.L.Lee, R.M.Sweet. *Nature (London)*, **362**, 219 (1993)
274. M.Newman, T.Strzelecka, L.F.Dorner, I.Schildkraut, A.K.Agarwal. *Structure*, **2**, 439 (1994)
275. H.Wu, J.W.Lustbader, Y.Lin, R.E.Canfield, W.A.Hendrickson. *Structure*, **2**, 545 (1994)
276. J.L.Smith, E.J.Zaluzec, J.-P.Wery, L.Niu, R.L.Switzer, H.Salkin, Y.Satow. *Science*, **264**, 1427 (1994)
277. J.M.Thomas. *Nature (London)*, **364**, 478 (1993)
278. S.M.Franken, H.J.Rozeboom, K.H.Kalk, B.W.Dijkstra. *EMBO J.*, **10**, 1297 (1991)
279. В.Дженкс. *Катализ в химии и энзимологии*. Мир, Москва, 1972
280. Э.Фершт. *Структура и механизм действия ферментов*. Мир, Москва, 1980
281. В.К.Антонов. *Химия протеолиза*. Наука, Москва, 1991
282. R.M.Stroud, L.M.Ray, R.E.Dickerson. *J. Mol. Biol.*, **83**, 185 (1974)
283. J.L.Chambers, R.M.Stroud. *Acta Crystallogr., Sect. B, Struct. Crystallogr.*, **33**, 1824 (1977)
284. J.L.Chambers, R.M.Stroud. *Acta Crystallogr., Sect. B, Struct. Crystallogr.*, **35**, 1861 (1979)
285. R.Huber, W.Bode. *Acc. Chem. Res.*, **11**, 114 (1978)
286. H.Fehlhammer, W.Bode. *J. Mol. Biol.*, **98**, 683 (1978)
287. W.Bode, P.Schwager. *J. Mol. Biol.*, **98**, 693 (1978)
288. A.Ruhlmann, D.Kukla, A.Schwager, D.M.Blow. *J. Mol. Biol.*, **77**, 417 (1973)
289. R.Huber, D.Kukla, W.Bode, P.Schwager, K.Bartels, J.Deisenhofer, W.Steigemann. *J. Mol. Biol.*, **89**, 73 (1974)
290. R.M.Sweet, H.T.Wright, J.Jonin, C.H.Chothia, D.M.Blow. *Biochemistry*, **13**, 4212 (1974)
291. M.Krieger, L.M.Kay, R.M.Stroud. *J. Mol. Biol.*, **83**, 209 (1974)
292. G.Lang, K.Spartalian, T.Yonetani. *Biochem. Biophys. Acta*, **451**, 250 (1976)
293. M.Chance, L.Powers, T.L.Poulos, B.Chance. *Biochemistry*, **25**, 1266 (1986)
294. S.L.Edwards, N.H.Xuong, R.C.Hamlin, J.Kraut. *Biochemistry*, **26**, 1503 (1987)
295. H.Pelletier, J.Kraut. *Science*, **258**, 1748 (1992)
296. I.Schlichting, J.Berendzen, G.N.Phillips, R.M.Sweet. *Nature (London)*, **371**, 808 (1994)
297. T.-Y.Teng, V.Srajer, K.Moffat. *Nature Struct. Biol.*, **1**, 701 (1994)
298. G.A.Petsko. *Nature (London)*, **371**, 740 (1994)
299. G.N.Phillips. *Biophys. J.*, **57**, 381 (1990)
300. S.Dasgupta, T.G.Spiro. *Biochemistry*, **25**, 5941 (1986)
301. M.R.Chance, J.L.Parkhurst, G.L.Woolery, B.Chance. *J. Biol. Chem.*, **261**, 5689 (1986)
302. Q.H.Gibson, R.Regan, R.Elber, J.S.Olson, J.E.Carver. *J. Biol. Chem.*, **268**, 17908 (1992)
303. K.Ruszera, J.C.Lambry, J.-L.Martin, M.Karplus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 5805 (1993)
304. D.E.McRee. *Practical Protein Crystallography*. Academic Press, New York, 1993
305. D.W.Green, V.M.Ingram, M.F.Perutz. *Proc. R. Soc. London, A Math. Phys. Sci.*, **225**, 287 (1954)
306. H.Honl. *Z. Phys.*, **84**, 1 (1933)
307. J.Karle. *Int. J. Quantum Chem. Symp.*, **7**, 357 (1980)
308. W.A.Hendrickson. *Trans. Am. Crystallogr. Assoc.*, **21**, 11 (1985)
309. W.A.Hendrickson, M.M.Teeter. *Nature (London)*, **290**, 107 (1981)
310. R.Kahn, R.Fourme, R.Bosshard, M.Chaimdi, J.L.Risler, O.Didiberg, J.P.Wery. *FEBS Lett.*, **179**, 133 (1985)
311. S.Harada, M.Yasui, K.Mirikawa, N.Kasai, Y.Satow. *J. Appl. Crystallogr.*, **19**, 448 (1986)
312. Z.R.Korzun. *J. Mol. Biol.*, **196**, 413 (1987)
313. W.A.Hendrickson. *Acta Crystallogr., Sect. A, Fund. Crystallogr.*, **40**, 3 (1984)
314. J.L.Smith, A.Pahler, H.M.K.Murthy, W.A.Hendrickson. *Acta Crystallogr., Sect. A, Fund. Crystallogr.*, **43**, 10 (1987)
315. W.A.Hendrickson, J.M.Troup, N.Swepston, G.Zdansky. *Abstracts of the American Crystallographic Association. Ser. 2*, **14**, 48 (1986)
316. W.A.Hendrickson, J.L.Smith, R.Phizackerley, E.A.Meritt. *Proteins*, **4**, 77 (1988)
317. W.A.Hendrickson, J.R.Horton, D.M.Le Master. *EMBO J.*, **9**, 1665 (1990)
318. D.B.Cowie, G.N.Cohen. *Biochim. Biophys. Acta*, **26**, 252 (1957)
319. D.M.Le Master. *J. Virol.*, **59**, 759 (1986)
320. W.A.Hendrickson. *Science*, **254**, 51 (1991)
321. Z.Otwinowski. In *Isomorphous Replacement and Anomalous Scattering*. (Eds W.Wolf, R.Evans, A.G.W.Lestie). Science and Engineering Research Council, Daresbury Laboratory, Daresbury, UK, 1991. P.80

322. G.Bricogne. In *Isomorphous Replacement and Anomalous Scattering*. (Eds W.Wolf, R.Evans, A.G.W.Lestie). Science and Engineering Research Council, Daresbury Laboratory, Daresbury, UK, 1991. P.60
323. M.Newman, T.Strzelecka, L.F.Dorner, I.Schildkraut, A.K.Agarwal. *Structure*, **2**, 439 (1994)
324. Wu Hao, J.W.Lustbader, Lin Yee, R.E.Canfield, W.A.Hendrickson. *Structure*, **2**, 545 (1994)

ADVANCES IN X-RAY CRYSTALLOGRAPHY OF PROTEINS

E.M.Popov

*M.M.Shemyakin and Yu.A.Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry Russian Academy of Sciences
16/10, Ul. Miklukha-Maklaya, 117871 Moscow, Russian Federation, Fax +7(095)310-7007*

The contemporary situation and the possible developments of x-ray crystallography of globular proteins are reviewed. The mechanisms of functioning of the membrane receptors, the T-lymphocyte immune proteins, the octameric histone core of the nucleosome, the DNA topoisomerase, the retroviral aspartate proteases, the actomyosin complex of skeletal muscles are discussed in the view of the recent x-ray structural data. A special accent is made on novel techniques, such as time-resolved x-ray crystallography, a combination with electron microscopy and cryo-crystallography. Impressive progress in this field opens principally new opportunities for x-ray structural studies. Introduction of synchrotron x-ray sources and possibilities to avoid a multiple isomorphous substitution not only simplifies investigations of protein structure, but also provides a new approach to previously unattainable information on the three-dimensional structure of the protein intermediates.

Bibliography — 324 references.

Received 23rd June 1995