В. А. Карасев, В. В. Лучинин

ВВЕДЕНИЕ В КОНСТРУИРОВАНИЕ БИОНИЧЕСКИХ СИСТЕМ



М: ФИЗМАТЛИТ, 2009

ОГЛАВЛЕНИЕ

От авторов 9

I. Физико-химический базис

Глава 1. **Материаловедческая база бионических наносистем** 11
1.1. Основные понятия и представления 11
1.2. Особенности биоструктур как основы создания функционально-ориентированных систем 13
1.3. Свойства биоструктур как перспективных материалов 14
1.3.1. Структурно-энергетическая стабильность и вариабельность (14). 1.3.2. Пространственно-временной полиморфизм (14). 1.3.3. Внутренние источники энергии и зарядов (14). 1.3.4. Сверхсенсорность и селективность (15). 1.3.5. Структурно-функциональная организация на основе принципа «матрицы» (16).
1.4. Переход от неорганических к бионическим наноструктурам 17
Литература к главе 1 20

Глава 2. **Строение биомолекул и биополимеров** 22
2.1. Нуклеиновые кислоты. 22
2.1.1. Строение цепей нуклеиновых кислот (22). 2.1.2. Классификация и надмолекулярная структура нуклеиновых кислот (24). 2.1.3. Значение принципа комплементарности (26).
2.2. Белки 26
2.2.1. Строение и номенклатура аминокислот (26). 2.2.2. Пептидная связь (27). 2.2.3. Причина предпочтения α-аминокислот и пептидной связи в биополимерах (29). 2.2.4. Канонический набор аминокислот (31). 2.2.5. Механизм биосинтеза белка (37).
2.3. Липиды 37
2.3.1. Холестерин (38). 2.3.2. Фосфолипиды (38).
Литература к главе 2 42

Глава 3. **Принципы надмолекулярной организации биологических структур** . . . 43
3.1. Физико-химические основы формирования надмолекулярных структур 43
3.1.1. Взаимодействие надмолекулярных структур с водой (43). 3.1.2. Гидрофобные взаимодействия (44). 3.1.3. Силы Ван-дер-Ваальса (45). 3.1.4. Полярные взаимодействия (46). 3.1.5. Системы водородных и солевых связей (47).
3.2. Общая организация надмолекулярных структур 48
3.2.1. Уровни организации биоструктур (49). 3.2.2. Симметрия (49). 3.2.3. Периодичность надмолекулярных структур (52). 3.2.4. Область контакта субъединиц (54).

3.3. Третичная структура белков 56
3.3.1. Подходы к классификации третичных структур (56). 3.3.2. Примеры укладок доменов третичных структур (57). 3.3.3. Классификация третичных структур в базе данных КАТС (58).
3.4. Вторичная структура белков 59
3.5. Первичная структура белков 61
3.5.1. Подходы к предсказанию вторичной структуры белков на основе их первичной структуры (61). 3.5.2. Понятие «мотива» и его использование в анализе белковых цепей (62).
3.6. Проблема самоорганизации структуры белков. 62
3.6.1. Модели сворачивания белков (63). 3.6.2. Ко-трансляционный механизм сворачивания белков (65). 3.6.3. Обсуждение проблемы самоорганизации биополимеров (67).
Литература к главе 3 69

Глава 4. **Механизмы переноса энергии и зарядов в биоструктурах** 81
4.1. Экспериментальные подходы к изучению биоэнергетики. 81
4.1.1. Биоэнергетическое направление (81). 4.1.2. Изучение механизмов дальнего переноса электронов в белках (89). 4.1.3. Исследование механизмов дальнего переноса зарядов в ДНК (92).
4.2. Теоретические подходы в биоэнергетике 95
4.2.1. Гипотезы о специфических каналах переноса зарядов в биоструктурах (95). 4.2.2. Модели переноса зарядов в белках (96). 4.2.3. Модели переноса зарядов в ДНК (97). 4.2.4. Механизм солитонного переноса энергии (97). 4.2.5. Модели переноса зарядов, учитывающие эффекты кето-енольной таутомерии и перемещения водородных связей (98). 4.2.6. Основные требования к механизму переноса зарядов с точки зрения электроники (99).
Литература к главе 4 101

II. Системно-методологический подход

Глава 5. **Концепция систем сопряженных ионно-водородных связей** 107
5.1. Основные понятия и представления 107
5.1.1. Понятия простой и резонансной группы. Таблица групп, встречающихся в составе биомолекул (107). 5.1.2. Биомолекулы, содержащие простые и резонансные группы (108). 5.1.3. Свойства групп, проявляемые по отношению к атомам водорода (114). 5.1.4. Системы на основе простых и резонансных групп, построенные с участием водородных связей (115). 5.1.5. Введение представлений о «системах сопряженных ионно-водородных связей» (ССИВС) (116). 5.1.6. Универсальный характер ССИВС (117).
5.2. Модель переноса зарядов по ССИВС. 118
5.2.1. Исходные предпосылки модели (118). 5.2.2. Обобщенная схема модели (120). 5.2.3. Роль молекул воды в ССИВС и переносе зарядов (121). 5.2.4. Условия реализации модели в бионических наноструктурах (121). 5.2.5. Сопоставление модели с современными концепциями биоэнергетики (123).
Литература к главе 5 125

Глава 6. **Биоструктуры и биомолекулы в рамках концепции ССИВС** 127
6.1. Базовая архитектура бионических наноструктур 127

6.1.1. Следствия механизма переноса зарядов по ССИВС (127). 6.1.2. Белки (127). 6.1.3. Нуклеиновые кислоты (128). 6.1.4. Фосфолипиды (129). 6.1.5. Перспективы для наноэлектроники (129).

6.2. Базовые элементы 129
6.2.1. Вилочковая водородная связь как потенциальный узел для создания элемента ИЛИ (130). 6.2.2. Аминокислоты (133). 6.2.3. Работа аминокислот в составе ССИВС олигомерных структур (139). 6.2.4. Азотистые основания (139). 6.2.5. Пары азотистых оснований нуклеиновых кислот (141). 6.2.6. Молекулы хинонов (142). 6.2.7. Доноры зарядов (144).

6.3. Полифункциональность биологических молекул 145
6.3.1. Вырожденность числа выходов (145). 6.3.2. Изменение функций биомолекул путем модификации входов и выходов (146).

Литература к главе 6 149

Глава 7. **Реализация принципа непрерывности ССИВС в биоструктурах** 151

7.1. Базовые положения 151

7.2. Белковые структуры 154
7.2.1. Взаимодействие базовых структур и боковых цепей аминокислот при участии ССИВС (154). 7.2.2. Связь кофакторов с белками (158).

7.3. Нуклеиновые кислоты и их комплексы с белками 163
7.3.1. Модельные комплексы фрагментов нуклеиновых кислот и узнающих их белков (164). 7.3.2. Структура ССИВС нуклеосом (166).

7.4. Рекомендации конструктору наноструктур, использующему представления о ССИВС 169

Литература к главе 7 171

III. Физическо-технологические реализации бионических наносистем

Глава 8. **Модель топологического кодирования цепных полимеров** 173

8.1. Принцип непрерывности ССИВС как основа модели топологического кодирования 173
8.1.1. Механизм самоорганизации наноструктур (173). 8.1.2. Тиражирование структур как причина появления системы кодирования (174). 8.1.3. Элементы системы топологического кодирования (175).

8.2. Топологический код 175
8.2.1. Суперматрица конформаций 4-х-звенного цепного графа как основание топологического кода (175). 8.2.2. Трансформация суперматрицы в топологический код (181).

8.3. Алгоритм кодирования n-звенного графа и цепного полимера 183
8.3.1. Матрица состояний связности n-звенного графа (184). 8.3.2. Выбор логики и кодирование структуры n-звенного цепного графа (185). 8.3.3. Общий вид алгоритма «кодирования-декодирования» n-звенного графа (186). 8.3.4. Построение структуры n-звенного графа (188).

8.4. Физические операторы и их соответствие триплетам топологического кода 188
8.4.1. Введение понятия «физический оператор» (188). 8.4.2. Общие требования к структуре физических операторов (189). 8.4.3. Соответствие операторов связности и антисвязности блокам триплетов топологического кода (190). 8.4.4. Воссоздание симметричных конформаций физическими операторами (191).

8.5. Молекулярная векторная машина 191

8.5.1. Этапы построения МВМ (192). 8.5.2. Свойства векторов додекаэдра (195). 8.5.3. Канонический набор физических операторов (197). 8.5.4. Свойства тетраэдрического α-атома (202). 8.5.5. Модель МВМ как основа систематизации функциональных групп физических операторов (205).

8.6. Модель топологического кодирования и биоструктуры 206
8.6.1. Развитие представлений о пространственной структуре генетического кода (206). 8.6.2. Трансформация суперматрицы в триплетный генетический код (214). 8.6.3. Анализ свойств генетического кода с позиции модели (216).

8.7. Реализация модели молекулярной векторной машины в биоструктурах 221
8.7.1. Классификация боковых цепей аминокислот (222). 8.7.2. Свойства молекулярной векторной машины для сворачивания белков (227). 8.7.3. Вырожденность свойств боковых цепей аминокислот и вырожденность триплетов генетического кода. Двухъярусная модель МВМ (231). 8.7.4. Модель МВМ как основа систематизации функциональных групп боковых цепей аминокислот (232).

8.8. Значение модели топологического кодирования цепных полимеров, перспективы ее развития и применения 236

Литература к главе 8 238

Глава 9. **Модель топологического кодирования цепных полимеров и структура белков** 241

9.1. Декодирование триплетных последовательностей белков с помощью алгоритма кодирования–декодирования 241
9.1.1. Пример декодирования фрагмента цепного полимера (241). 9.1.2. Апробация алгоритма на фрагменте белковой структуры (242).

9.2. Анализ 4-х-звенных двойных циклов в белках с позиции молекулярной векторной машины 248
9.2.1. Частота встречаемости двойных 4-х-звенных циклов (249). 9.2.2. Распределение аминокислот внутри основных циклов (250). 9.2.3. Боковые цепи аминокислот — элементы молекулярной векторной машины (256). 9.2.4. Взаимоотношения боковых цепей, находящихся в i-м и $(i-4)$-м положениях 4-х-звенных циклов. Структурно-функциональные узлы ближнего порядка (269).

Литература к главе 9 288

Глава 10. **Олигомерные катализаторы как молекулярные процессоры** 290

10.1. Модель молекулярного катализа на основе ССИВС 290
10.1.1. Принцип обратной связи как механизм катализа при участии ССИВС (290). 10.1.2. Синхронизация переноса зарядов по ССИВС со стадиями превращения субстрата (291). 10.1.3. Аллостерическая регуляция процесса катализа (292). 10.1.4. Реализация механизма переноса зарядов по ССИВС (292). 10.1.5. Динамический вариант модели биокатализа (294).

10.2. Развитие представлений о сущности ферментативного катализа. 296
10.2.1. Общие концепции (297). 10.2.2. Возможные механизмы использования энергии, выделяющейся в процессе биокатализа (298). 10.2.3. Походы, учитывающие олигомерную структуру ферментов (299). 10.2.4. Реакционная способность половины от числа активных центров в олигомерных ферментах и ее возможные объяснения (300). 10.2.5. Особенности современного этапа исследований биокатализа (302). 10.2.6. Модель катализа на основе ССИВС и существующие представления о механизмах работы ферментов (303).

10.3. Приложение модели катализа на основе ССИВС к реальным ферментам 305
10.3.1. Выбор объектов для анализа (305). 10.3.2. Алкогольдегидрогеназа (305). 10.3.3. Н-аденозинтрифосфатаза (313). 10.3.4. Роль фосфатных групп

как элементов, активирующих перенос зарядов в ССИВС надмолекулярных структур (317).

10.4. «Флип-флоп»-механизм в биокатализе: гипотеза универсальности 318
10.4.1. Объяснение «флип-флоп»-механизма с позиции модели катализа на основе ССИВС (318). 10.4.2. Распространение «флип-флоп» механизма катализа в различных классах ферментов (319). 10.4.3. Экспериментальные доказательства в пользу физической реальности «флип-флоп» механизма (329).

10.5. Происхождение олигомерных ферментов и проблемы биогенеза 330
10.5.1. Краткий обзор концепций биогенеза (331). 10.5.2. Концепция эволюционного катализа как основа для построения модели происхождения ферментов (331). 10.5.3. Популяционно-матричная модель формирования олигомерных ферментов (338).

10.6. Модель катализа на основе ССИВС и ее значение для разработки проблем бионической наноэлектроники, биокатализа и биогенеза. 345

Литература к главе 10 347

Глава 11. **Молекулярные мембраны — большие интегральные структуры** 358

11.1. Зонно-блочная модель мембранных структур на основе ССИВС. 358
11.1.1. Зонная структура мембран (359). 11.1.2. Блочная организация мембранных структур (360). 11.1.3. Асимметрия двумерной структуры мембран (363). 11.1.4. Обобщенная модель мембранных структур на основе ССИВС (364).

11.2. Зонно-блочная модель биологических мембран: роль молекул фосфолипидов 366
11.2.1. Фосфолипиды как основа базовой архитектуры биомембран (366). 11.2.2. Формирование зон ССИВС дальнего порядка (368). 11.2.3. Связь молекул фосфолипидов с белками (369).

11.3. Анализ современных данных о структуре и функциях биомембран. 371
11.3.1. Эволюция представлений о структуре биомембран (371). 11.3.2. Зонная структура биомембран (374). 11.3.3. Блочная двумерная организация биомембран (384).

11.4. Физическая реконструкция зонно-блочной модели биомембран 385
11.4.1. Предпосылки к реконструкции зонно-блочной модели биомембран (385). 11.4.2. Исследование структуры кристаллов аналогов фосфолипидов (386). 11.4.3. Изучение электрофизических свойств модельных кристаллов (391). 11.4.4. Расчеты электронной структуры кристаллов ИФЭА-HCl методами квантовой химии (398). 11.4.5. Получение комплексных кристаллов аналогов фосфолипидов (399). 11.4.6. Перспективы развития предложенного а подхода по физической реконструкции зонно-блочной модели биомембран (404). 11.4.7. Общие рекомендации по конструированию мембранных структур (406).

Литература к главе 11 408

Глава 12. **Хемосенсорные структуры** 412

12.1. Принципы конструирования хемосенсоров на основе концепции ССИВС 412
12.1.1. Идея сенсора, заложенная в концепции ССИВС (412). 12.1.2. Модель сенсора, учитывающая механизм переноса зарядов по ССИВС (414).

12.2. Межсистемные рецепторы 416
12.2.1. Рецепторы микроорганизмов (416). 12.2.2. Обонятельные и вкусовые рецепторы (417).

12.3. Внутрисистемные рецепторы 421
12.3.1. Рецепторы медиаторов и гормонов головного мозга (421). 12.3.2. Гормоны щитовидной железы (434). 12.3.3. Рецепторы стероидных гормонов (436).

12.4. Внутриклеточные рецепторы 440

12.4.1. Анализ молекул cAMP в составе ССИВС (440). 12.4.2. Взаимодействие cAMP с протеинкиназами (440). 12.4.3. Циклический AMP как активатор генов (443).

12.5. Обсуждение модели работы хемосенсоров 445

12.5.1. Краткие итого проведенного обзора литературы (445). 12.5.2. G-белки как возможные источники зарядов (447). 12.5.3. Возможные рекомендации конструктору хемосенсорных структур (448).

Литература к главе 12 450

Заключение 455

ОТ АВТОРОВ

В развитии любой науки есть разные периоды. Примером может служить развитие молекулярной биологии. От периода становления в начале 50-х годов прошлого века (первый ее результат — структура ДНК), эта наука к началу нынешнего столетия пришла к этапу свой зрелости. Вершиной этого периода стала полная расшифровка нуклеотидной последовательности генома человека. Однако после времени «разбрасывания камней», анализа фактов, с неизбежностью наступает период синтеза, «собирания камней» и для молекулярной биологии он уже идет. Для того чтобы такой процесс протекал успешно, особую актуальность приобретает построение синтетических концепций и теорий, которые позволили бы соединить воедино накопленный грандиозный фактический материал.

Примером другой науки, также появившейся в 20-м веке, является наноэлектроника. Ее появление можно отнести к 80-м годом, когда логика развития микроэлектроники поставила в повестку дня проблему дальнейшей миниатюризации электронных устройств. Большинство исследователей согласно с тем, что пределом миниатюризации могут быть только молекулы. В отличие от молекулярной биологии, наноэлектроника несколько застряла на периоде «разбрасывания камней». До сих пор не появилось какого-либо генерального направления, которое привело бы к таким значительным результатам, как в молекулярной биологии. Завидовать последней вряд ли стоит — она пожинает плоды эволюционного развития живой природы, происходившего миллиарды лет. Однако позаимствовать какие-либо идеи и принципы из биологии безусловно было бы полезно, поскольку биологические молекулярные устройства своим существованием доказали жизнеспособность заложенных в них принципов.

Эта книга написана двумя авторами: биологом (к. б. н. В. А. Карасев) и специалистом в области микроэлектроники (д. т. н. В. В. Лучинин). Такое творческое содружество оказалось достаточно плодотворным. Пересечение и взаимодействие двух наук с одной стороны, обогащает молекулярную биологию новым взглядом на природу биоструктур как наноэлектронных устройств, а с другой стороны, наноэлектроника черпает новые идеи на основе познанных принципов молекулярной биологии.

Построение теоретических систем, как известно, носит аксиоматический характер. Примером может служить создание в 20-м веке теории относительности А. Эйнштейном и квантовой механики А. Гейзенбергом и Э. Шредингером. Мы исходим из того, что молекулярная биология, хотя и является в настоящее время в основном экспериментальной, также может быть построена как аксиоматическая наука. Для этого, очевидно, как и при построении физических теорий, необходимо задать ряд экспериментально проверяемых постулатов и попытаться на основе внутренней логики развития этих постулатов получить основные наблюдаемые в биологии механизмы и структуры. Такими основополагающими постулатами в настоящей книге являются принцип непрерывности систем сопряженных ионно-водородных связей при построении надмолекулярных биоструктур и принцип сопряжения через водородную связь

для передачи энергии в этих структурах. Как мы увидим из этой книги, появление структур и механизмов, рассматриваемых в молекулярной биологии, в частности, свойства аминокислот и азотистых оснований, биокатализ, структура биомембран, особенности генетического кода и другие могут быть объяснены с позиции этих постулатов. Будет показана применимость этих идей и при разработке проблем наноэлектроники.

Сложность задачи, поставленной авторами при написании этой книги, состоит в том, чтобы на профессиональном уровне, но доступно для неспециалистов, изложить идеи и факты молекулярной биологии, а идеи, развиваемые в микроэлектронике, понятно сформулировать для биологов. В связи с этим в трех вводных главах первой части книги будет изложен материал, достаточно известный специалистам, но мало знакомый коллегам из других областей. Однако его изложение необходимо, поскольку иначе будет трудно понять и оценить новизну предлагаемого подхода. Центральная часть книги посвящена изложению «системной идеи» — концепции систем сопряженных ионно-водородных связей, ее обоснованию и прямому использованию. Наконец, в третьей части книги изложены воплощения этой идеи, имеющие с ней несколько более отдаленную с ней связь. На первый взгляд, связь этой идеи с генетическим кодом, биокатализом, биомембранами и биосенсорикой трудно уловить. Однако авторы надеются, что из прочтения книги читатели увидят, что такая связь реально существует.

Книга содержит большой фактический материал, который может быть использован в учебных целях студентами, специализирующихся в области биофизики и наноэлектроники. Мы рассчитываем, что и специалисты разных специальностей, критически воспринимая те или иные идеи, смогут извлечь из книги какое-либо рациональное зерно.

В процессе написания мы использовали, существенно обновив, материал предыдущих монографий, а также результаты работ, проводимых в Центре микротехнологии и диагностики (ЦМИД) Санкт-Петербургского государственного электротехнического университета (СПб ГЭТУ «ЛЭТИ»).

Авторы считают своим долгом выразить благодарность сотрудникам СПб ГЭТУ (доц. В. П. Мирошкину, Е. Л. Демченко), а также коллегам из Санкт-Петербургского государственного университета проф. Р. А. Эварестову, доц. В. Е. Стефанову, к. г.-м. В. Д. Франке, с. н. с. В. С. Фундаменскому и др., совместные работы с которыми использованы в данной книге.

Для изучения материалов данной книги будет полезно применение разработанной нами вместе с программистом Е. Л. Демченко компьютерной программы Protein 3D. Эта программа, а также использованные в книге файлы белков, переписанные из Protein Data Bank (PDB-файлы), записана на компакт-диск. Читатели могут бесплатно получить его, если вышлют запрос по электронной почте: genetic-code@narod.ru со своим обратным адресом. С вопросами, связанными с топологической структурой генетического кода, можно ознакомиться на сайте: http://genetic-code.narod.ru/.

Не будем скрывать: многие из идей, изложенных в этой книге, еще достаточно долгое время будут предметом дискуссий и последующих разработок. Какие-то из сформулированных идей окажутся ложными и будут забыты. Однако авторы выражают надежду, что некоторые из поставленных и решенных вопросов будут полезны как для развития молекулярной биологии, так и для наноэлектроники. И в этом появление данной книги найдет свое оправдание.

Часть I

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЙ БАЗИС

Глава 1
МАТЕРИАЛОВЕДЧЕСКАЯ БАЗА БИОНИЧЕСКИХ НАНОСИСТЕМ

1.1. Основные понятия и представления

В настоящее время осуществляется активный поиск возможного материаловедческого базиса микро- и наносистем следующих поколений для восприятия, преобразования, хранения и передачи энергии и информации. В качестве доминирующих направлений в данной области можно выделить:

— синтез композиций пониженной размерности (искусственные и естественные нульмерные, одно- и двумерные сверхструктуры);

— синтез новых материалов и композиций, имитирующих структурную организацию отдельных элементов биосистем и биологические принципы материально-энергетического и информационного взаимодействия с внешней средой;

— применение надмолекулярных органических композиций для создания сенсоров и моделирования устройств хранения и обработки информации с учетом таких известных свойств как селективность и сверхсенсорность, адаптивность и ассоциативность;

— создание атомно-молекулярной технологии, адекватной решаемому уровню задач через реализацию процессов атомно-молекулярной эпитаксии и модифицирования, молекулярного наслаивания и сборки.

В связи с ранее сказанным в последнее время в литературе [1, 2] достаточно широко «эксплуатируются» такие термины, как: молекулярная электроника, биоэлектроника, биомолекулярная электроника и нанобиоэлектроника. К сожалению, данные понятия и сферы их применения однозначно не определены. Более того, поскольку данные «синтетические» понятия возникли на стыке биологического и физического знаний, появляются публикации, в которых специалисты того или иного профиля пытаются взять «под свое крыло» зарождающееся направление.

Наиболее часто встречающееся «биологическое» утверждение сводится к тому, что «биомолекулярная электроника (нанобиоэлектроника) — это новое научное направление биотехнологии, ориентированное на создание электронных вычислительных и измерительных устройств на основе биологических материалов и принципов. Другое имеет явно противоположную «физическую» направленность утверждая, что «целью исследований в области биоэлектроники является имитация переноса электрона на молекулярном уровне» [1].

Однако часто именно сторонники «биологического» подхода рассматривают биоматериалы отдельно от их биологических функций. Предметом исследования становятся лишь определенные свойства, которые необходимо совершенствовать для использования.

В этих условиях, когда биологические среды рассматриваются только как новые материалы для синтеза более сложных технических систем с классическими принципами организации и функционирования, естественно теряется значительная часть их «биологической специфичности». Еще в конце прошлого века неоднократно высказывалась идея о том, что «вещество, в частности, органической природы по сути своей инертно», но будучи организовано определенным образом, например, как это имеет место в структурах клетки, приобретает способность особым образом реагировать на внешние воздействия и именно эта особенность — одно из фундаментальных свойств живого.

Представленное чисто физическое толкование биоэлектроники чрезвычайно ограничено из-за потери достаточно важного аспекта при создании информационных систем нового поколения — «биологических» алгоритмов и принципов функционирования. На возможность и необходимость использования принципов функционирования биосистем для развития общей теории автоматов указывал еще фон Нейман [3].

При решении вопроса с позиций «изолированных биоматериалов» специфическим остается только принцип биологической универсальности утверждающий, что в основе любой биосистемы, независимо от уровня ее сложности, лежит известный ограниченный набор аминокислот и нуклеотидов.

Безусловно, желательно, чтобы при рассмотрении биосред как материаловедческого базиса искусственных систем максимально использовались присущие им специфические свойства, как на этапе синтеза, так и функционирования. При этом нельзя игнорировать и утверждение о тот, что «любая сложная целенаправленная система (в том числе и биологическая) является одновременно и физической, а следовательно должна подчиняться и физическим законам» [4].

Общая ситуация осложняется также терминологическим многообразием при материаловедческой характеристике использования базиса биомолекулярной электроники. Анализ показал, что в этой «синтетической» области знаний используется целая гамма понятий (биоматериалы, биоорганические материалы, биополимеры, органические полимеры, органические полупроводники, молекулярные полупроводники, молекулярные кристаллы, биокристаллы, органические кристаллы, биоструктуры, надмолекулярные структуры). Различные исследователи и особенно с физико-техническим генезисом, оперируют этими понятиями достаточно свободно, не учитывая, что проявления тех или иных специфических свойств биосреды определяются, в первую очередь, уровнем ее «сложности» в отношении пространственно-временной и вещественно-энергетической организации.

Определяя совокупность понятий для дальнейшего изложения, воспользуемся такими распространенными терминами, которые носят энциклопедический характер: биокристаллы, биополимеры, надмолекулярные биоструктуры (bios — жизнь, bion — элемент жизни), а также термин «биосреды».

Биологические кристаллы — кристаллы построенные из биологических макромолекул, — белков, нуклеиновых кислот и вирусных частиц [5].

Биополимеры — природные высокомолекулярные соединения, являющиеся основой всех живых организмов. К биополимерам относятся: белки, нуклеиновые кисло-

ты, полисахариды; известны также смешанные полимеры, например, липопротеиды — комплексы, содержащие белки и липиды [6].

Надмолекулярные структуры — упорядоченным образом организованные комплексы биомакромолекул — белков — с белками, нуклеиновыми кислотами, полисахаридами, липидами и т. д. Как правило, эти структуры обладают сложной, многоуровневой организацией, основой которой часто являются водородные связи.

Биосреды — сформированные определенным образом биоструктуры, предназначенные для технического использования.

Исходя из названия главы, определим также из энциклопедических источников понятие «бионика».

Бионика — наука, пограничная между биологией и техникой, решающая инженерные задачи на основе анализа структуры и жизнедеятельности организмов [7], или, согласно медицинской энциклопедии [8], бионика — наука, изучающая возможности инженерно-технического применения информационно-управляющих и конструкционно-энергетических принципов, реализованных в живых организмах.

Не продолжая далее полемики, определим возможные направления развития элементной базы для нового поколения технических систем восприятия, преобразования, хранения и передачи энергии и информации [9]:

— приборы и устройства на основе традиционных веществ, искусственно организованных или спонтанно организующихся в комплексы, имитирующие некоторые элементарные функции, присущие гетерогенным композициям из биомолекул;

— приборы и устройства на основе биокристаллов и полимеров, искусственно организованных или спонтанно организующихся в комплексы, имитирующие элементарные или сложные функции, присущие гетерогенным композициям надмолекулярных структур;

— приборы и устройства на основе совокупности гетерогенных надмолекулярных структур, естественно объединенных структурно-функционально в бионическую систему.

Понимая сложность комплексного решения данной проблемы и в тоже время ее актуальность своеобразным эпиграфом к далее изложенному материалу можно считать известное высказывание Б. Гудвина [10]: «В той же степени в какой неверные аналогии могут привести к неверным выводам и ввести в заблуждение, подлинные гомологии и изоморфизмы могут оказаться чрезвычайно полезными, если учесть возможность взаимного обогащения областей, которые в настоящее время изолированы друг от друга».

Настоящая глава направлена на структурно-функциональный и вещественно-энергетический анализ материаловедческого базиса искуственных бионических микро- и наносистем.

1.2. Особенности биоструктур как основы создания функционально-ориентированных систем

Анализируя функциональный базис трех наиболее перспективных направлений использования биосред (биосенсоры, биопротезы и биокомпьютеры), обратим внимание на ряд особенностей биоструктур, пригодных для создания сложных функциональных систем:

— преобразование и генерация информации связано в них с кооперативными нелинейными процессами и распараллеливанием информационных каналов;

— процессы усиления, связанные со встроенными источниками энергии и электрического потенциала, сочетаются с переносом заряда и энергии практически без потерь;

— селективность по отношению к внешним информационным и технологическим возмущениям обеспечивает локализацию и избирательность воздействия;

— синтез структур основан на использовании процессов матричного копирования, самосборки, самоорганизации и отбора.

Следует учитывать также конформационные свойства биомакромолекул и их комплексов [11, 12].

1.3. Свойства биоструктур как перспективных материалов

1.3.1. Структурно-энергетическая стабильность и вариабельность. Биоорганические материалы более разнообразны по своим структурным и физико-химическим свойствам, чем традиционные неорганические, хотя их материаловедческая основа представляет собой линейные цепи, состоящие из апериодических звеньев, либо на основе атомов углерода (белки, липиды, полисахариды), либо фосфора (нуклеиновые кислоты).

Оба элемента — углерод и фосфор — является общими для материалов органической и неорганической природы, но их «консерватизм», проявляющейся в образовании ковалентного тетраэдра, обеспечивает структурно-энергетическую стабильность и вариабильность. Детализируя некоторые особенности структурной организации данных материалов отметим, что они, как и неорганические, могут быть трехмерно — (каркасные решетки), двумерно — (слоистые структуры), одномерно — (цепочечные, линейные структуры) и нульмерно — (островковые, точечные структуры) упорядочены, но сохраняют достаточно высокую подвижность структурных фрагментов.

В сравнении с неорганическими, биоорганические материалы обладают существенно меньшей температурной устойчивостью. Однако это не означает, что системы на биооснове уступают в надежности обработки информации, если учесть разнообразие строения и особенностей функционирования биоструктур [13].

1.3.2. Пространственно-временной полиморфизм. Биологические кристаллы и полимеры склонны к изменению своего структурно-конформационного состояния, т. е. им присущ развитый пространственно-временной полиморфизм [14], проявляющейся во множестве структурно-устойчивых модификаций, определяющих многообразие свойств.

Структурный «конформизм», наблюдаемый относительно редко в объектах неорганической природы, в виде полиморфизма или политипизма, типичен для биосред, что подразумевает возможность широкого варьирования свойствами материала без использования примесного разнообразия, которое достигается в классической микротехнологии через реализацию процессов ростового легирования или очистки, диффузии и ионной имплантации [15].

1.3.3. Внутренние источники энергии и зарядов. Спецификой протекания энергетических процессов в биоструктурах является наличие внутренних источников энергии и заряда в виде молекул аденозинтрифосфата (АТФ), и других нуклеотидтри-

фосфатов; белковых фотореакционных центров, активируемых светом; встроенных генераторов электрического потенциала, создаваемого за счет переноса электронов и ионов в биомембранах.

Характерной особенностью большей части источников энергии и заряда, встроенных в биоструктуры, является их временная цикличность и значительная зависимость свойств от внешнего воздействия и внутреннего окружения.

В рамках классических макроскопических материаловедческих позиций биосреды могут сочетать в себе ряд свойств, связанных с переносом и хранением заряда типичных, как для диэлектрика, так и металла. Для биомолекул характерны конфигурационные переходы, определяемые как изомерная бистабильность, а также электронные превращения в молекулы, характеризуемые понятием электронная бистабильность.

Перенос заряда в биосредах может носить кооперативный характер, когда подобно «металлу» делокализованный заряд отражает системные свойства среды. В то же время в биосредах, как и в диэлектрических кристаллах, можно локализовать воздействие, инициируя некоторый вид зарядового состояния, определяемый конформационными и внутримолекулярными превращениями. Экспериментальная оценка подвижности носителей заряда в биокристаллах и биополимерах, дает чрезвычайно низкие ее значения — менее 1,0 $см^2/Вс$ [16]. Для объяснения переноса энергии и заряда на значительные расстояния используются представления о квантовых динамических системах и кооперативных эффектах. Кроме простейших механизмов переноса электронов и протонов, используются представления о туннелировании и коллективном перемещении таких динамических неоднородностей, как экситоны, солитоны, конформоны. В последнее время приобретает значение относительно старая концепция внутримолекулярного обмена за счет оптического излучения и электромагнитных колебаний, вплоть до использования радиочастот [17, 18].

Физика протекающих на молекулярном уровне процессов переноса энергии и заряда во многом определяет возможную архитектуру искусственно синтезируемых или естественных структур, которые могут выполнять определенные логические операции. В работах [19, 20] нами была сформулирована концепция систем сопряженных ионно-водородных связей (ССИВС), использующая для этих целей принцип сопряжения через водородную связь. Этот принцип привел к возникновению структур, существенно отличных от конструкций «солитонной логики» Картера, основанной на солитонном механизме переноса электрона по полисопряженным системам [21]. Данный вопрос будет более подробно рассмотрен в разделе, посвященном элементной базе бионических микро- и наносистем.

1.3.4. Сверхсенсорность и селективность. Как указывалось ранее, характерными особенностями биосред является их сверхсенсорность и селективность, основанные на ассоциативности восприятия информации [12]. При рассмотрении этих характеристик биосред обратим внимание на положение, сформулированное в работе [4] Ю. Г. Марковым: «В самом информационном воздействии важна не величина передаваемой энергии (без которой немыслимы вообще никакие воздействия), а пространственно-временная структура воздействующего материального носителя энергии».

Смещение центра тяжести в новых разработках вычислительных средств в область нейрокомпьютеров [22], в основу организации которых положена теория нейронных сетей, определили интерес к средам, в которых вычислительная адаптаци-

онная процедура установления весовых отношений элементов сети уступает место прямой ее естественной физической реализации [23, 24, 25]. Однако на пути создания эффективных физических сетей с параллельной «безадресной» корректировкой весовых отношений имеется ряд нерешенных проблем, главной из которых является выбор и практическая реализация элементной базы. Фактически основу сети составляют адаптивные элементы, которые должны обладать тремя свойствами: градуируемостью значений физического параметра, сохраняемостью значений параметров в памяти, способностью к адаптивному перераспределению значений градируемого параметра в коллективных взаимодействиях элементов. Чаще всего в качестве градируемой физической величины использовалась электрическая проводимость, что объясняется стремлением обеспечить регулирование весовых отношений путем изменения межэлементных связностей [26]. Этот период развития сетевых систем, именуемый коннекционизмом, дал различные варианты технического воплощения элемента сетевых систем: сервопотенциометр [27], гальванорезистор [28], МДП-транзистор и др. Однако их недостатки очевидны: либо низкое быстродействие, либо неспособность удовлетворить третьему из упомянутых выше требований к элементу — перераспределительному. Заметим, что проводимость как параметр адаптивных отношений, по-видимому, неперспективен ввиду трудностей обеспечения эффекта активного взаимодействия элементов в процессах адаптации. Прямое действие физических (термодинамических) сил является первопричиной адаптивного изменения физических величин (перетекание масс, зарядов), изменения проницаемости (диэлектрической, магнитной) и энергопропускания. В основе реализации физической адаптационной процедуры должен лежать принцип дополнительности физических сил [24]. В тоже время структурная иерархия в процессах адаптации обеспечивает избирательность систем к воздействию сигналов [29].

В ранней работе [23] нами были представлены результаты анализа исследований в области материаловедения сред, обладающих способностью к самоорганизации. Показано, что открытая система, основой которой является неорганическая среда, обладает иерархической эволюционной динамикой, т. е. способностью к отражению внешних воздействий (потоков) в виде специфических адаптивных структур называемых *рефлексивными*. Иерархия означает существование как минимум двух взаимодействующих эволюционных подсистем со значительно различающимися временами развития (релаксации) структурных элементов. Оперативная подсистема преобразует внешние силы (потоки) в их структурные коды, а консервативная играет роль памяти кодов, реализованной в виде относительно долго живущей «конструкции», активно влияющей на направление эволюционных процессов. Безусловно, что рассмотренные эффекты структурной рефлексии и комплементарности определяют специфику ассоциативной избирательности биосред к внешним воздействиям, т. е. сверхсенсорности и индифферентности.

В рамках данной книги далее излагается структурно-топологический подход к созданию искусственных бионических микро- и наносистем. В качестве частного случая рассматривается проблема получения высокоспецифичных сенсоров на основе белковых веществ через моделирование комплементарных пар «рецептор — распознаваемая среда».

1.3.5. Структурно-функциональная организация на основе принципа «матрицы». Биоструктуры с высоким уровнем сложности характеризуются

протеканием процессов самоорганизации, самосборки, матричного копирования и размножения. Наряду с широко известным принципом биологической универсальности (построение всего живого из ограниченного набора биомолекул и надмолекулярных структур), в современной биологии выделяют еще лишь два принципа, претендующих на фундаментальность:

— конвариантной редупликации дискретно построенных генов, хранящих наследственную информацию (принцип матрицы);

— конкурентных отношений (принцип естественного отбора).

В работе [30] при рассмотрении первого принципа указывалось, что «одно из главных проявлений жизни состоит не в нарастании массы живого», а в том, что множится число элементарных индивидов, при этом некоторое элементарное вещество строит себе подобное и отталкивает его от себя, давая начало новому индивидууму. Этот процесс называют не просто размножением, а именно редупликацией.

Принцип матрицы применительно к биосистемам сформулирован Н. К. Кольцовым [31]. Он заключается в том, что «наследственные молекулы» синтезируются матричным путем, т. е. фактически каждая молекула от молекулы.

Синтез «самих на себе», т. е. «подобное к подобному» не оптимален с точки зрения надежности воспроизведения структуры матрицы. Механизм матричного копирования основан на принципе комплементарности и классических представлениях о минимизации свободной энергии взаимодействующих элементов. В рамках общей теории матричного синтеза принцип обеспечивает максимальную точность копирования «антиподобного-комплементарного».

В реальных системах матричный синтез носит адаптивный характер, т. е. по существу отражает взаимодействие матрицы-субстрата и внешней (материнской) среды. Он несет в себе не только материальные элементы, необходимые для репликации, но и возмущения, могущие стать источником новой информации. Возможны изменения самообновляющейся матрицы через внешнее вещественно-энергетическое и полевое воздействие, в том числе в связи с созданием условий для протекания спонтанных процессов в открытой системе далекой от равновесия — самоорганизации [32].

По мнению многих исследователей трудно ожидать, что при изучении объектов живой и неживой природы вновь будет установлен столь явный изоморфизм в механизмах воспроизведения, подобный процессу матричного синтеза. Принципиальным отличием естественных биосистем от искусственных остается протекание в них специфического биологического процесса — размножения, когда не просто увеличивается масса за счет «каталитических» процессов упорядочения на поверхности матрицы, а образуется «подобное» с «отталкиванием» последнего и его индивидуализацией.

Следует отметить, что принцип матричной организации распространяется не только на процессы редупликации генетического материала. Большинство белков клетки организовано в структурно-функциональные ансамбли, которые встроены в особый тип надмолекулярных структур — биологические мембраны [33]. Эти структуры являются своеобразными матрицами, непосредственно осуществляющими адаптацию клетки к постоянно изменяющимся условиям существования.

1.4. Переход от неорганических к бионическим наноструктурам

Изделия интегральной электроники представляют собой сложную гетерогенную систему. Современные методы проектирования и изготовления микросхем сводятся

к реализации совокупности так называемых структурно-топологических операций, т. е. получению слоев с определенными свойствами и формировании в них топологических объектов, искусственно совмещаемых с предыдущим и последующим слоями. В качестве альтернативного подхода в работе [34] была поставлена задача устранения внешних совмещений, т. е. построение структуры должно осуществляться без участия оператора. Одним из условий этого является, согласно [34], замена комплекта шаблонов единым N-шаблоном. Множество элементов шаблона автор разбил на два непересекающихся подмножества: «черных», маскирующих элементов, и открытых элементов или «окон». Из задачи минимизации числа N с помощью топологически-временной развертки технологического процесса автор пришел к идее линеаризации топологии ИС путем проектирования ее как цепи ячеек из ν элементов, пространственное расположение которых соответствует последовательности технологических операций.

Этапы изготовления ИС автор представляет так (схема 1.1):

$$\begin{matrix} \rightarrow N\text{-шаблон} \rightarrow \\ \\ \leftarrow N^{**}\text{-шаблон} \leftarrow \end{matrix} \rightarrow N^{*}\text{-шаблон} \rightarrow N'\text{-маска} \rightarrow \begin{matrix} \text{синтез} \\ \text{активных} \\ \text{ячеек} \end{matrix} \rightarrow \begin{matrix} \text{форми-} \\ \text{рование} \\ \text{связей} \end{matrix}. \qquad (1.1)$$

Шаблоны определяют первую ступень кодирования, маска — вторую, N- и N^{*}-шаблоны образуют негативно-позитивную пару. Что касается топологического кода, то исходя из принципа минимизации N, автор показал, что число N должно быть четным, а ν — нечетно. Уже при $N = 4$ и $\nu = 3$ максимальное число кодируемых элементов равно 64, что вполне обеспечивает достаточное число элементов. Поэтому, согласно [34], скорее всего основание кода $N = 4$; $\nu = N - 1$; топологическое кодирование — двухступенчатое; код неперекрывающийся. Формально схема 1 идентична этапам синтеза белковых молекул. Это совпадение, очевидно, связано в обоих случаях с необходимостью надежного и массового синтеза сложной структуры. Важно, однако, что в работе [34] схема 1 возникла как следствие формально простой задачи — устранения совмещений при синтезе, при единственном критерии оптимизации ($N_{\text{мин}}$).

Описанные идеи, насколько нам известно, так и не были практически реализованы в условиях получения микросистем. Причина этого связана, по-видимому, с тем, что данная схема, аналогичная биосинтезу, адаптирована именно для реализации на молекулярном уровне, так как в ее основе лежат особенности конформационно — энергетического взаимодействия молекул. На этом уровне образование надмолекулярной структуры из уже сформированных линейных цепей ячеек, состоящих из ковалентно связанных относительно устойчивых фрагментов молекул, будет определяться как физико-химическими свойствами самих ячеек (которые могут быть стандартизованы и количество которых может быть существенно ограничено), так и взаимодействием цепи ячеек со средой. В применении к белкам можно сказать, что для них количество модулей ограничено 20 типами аминокислот, а для образования функциональных структур использована способность последних формировать системы водородных связей, как между собой, так и с полипептидной цепью. Средой белков является вода, в которой ряд аминокислот проявляют свойства гидрофобности.

Таким образом, в свете исторического взгляда, намечаются контуры новой парадигмы. Те представления, которые в биологии в течение длительного периода

постепенно пробивали себе дорогу (вспомним идеи о матричном копировании [31] и генетическом коде [35], со временем экспериментально подтвердившиеся), можно рассматривать как отдельные фрагменты формирующейся системы бионической наноэлектроники. К фрагментам этой системы, реализованной в биоструктурах, можно отнести и приведенную в книге концепцию ССИВС, представления о базовой архитектуре и базовых элементах, а также модель топологического кодирования. Однако, как мы увидим в ходе изложения, эти обобщения могут быть значительно шире и применимы к построению различных, неизвестных в биологии, систем бионической наноэлектроники. Хотя материальная основа этих систем будет иной, их теоретическим основанием останется концепция ССИВС, модель топологического кодирования цепных полимеров, а также построенная недавно модель молекулярной векторной машины. Не исключено, что со временем будут сделаны и другие обобщения, которые естественным образом войдут в развивающуюся теоретическую систему.

В связи с выше сказанным вполне очевидно обращение к биологическим надмолекулярным структурам различного уровня иерархической сложности, как к своеобразному испытательному полигону систем наноэлектроники, прошедшему проверку естественным отбором и фактором времени. По этой причине в нашей книге мы постоянно будем обращаться к фактам и результатам, полученным в биологии, имея, однако, в виду, что для бионической наноэлектроники они носят частный характер и являются конкретной реализацией более общих принципов.

Литература к главе 1

1. *Лорд Н.*, *Гирогосиан П.*, *Уэллетт Р. и др.* Вычислительные машины будущего. — М.: Мир, 1987. — 192 с.
2. Всесоюзная школа-семинар по биомолекулярному компьютингу. Тезисы докладов. — М.: Международный научно-исследовательский институт проблем управления, 1991. — 88 с.
3. *Нейман Дж.* Теория самовоспроизводящихся автоматов. — М.: Мир, 1971. — 382 с.
4. *Марков Ю.Г.* Функциональный подход в современном научном познании. — Новосибирск: Наука, 1982. — 182 с.
5. Физический энциклопедический словарь / Под ред. А.М. Прохорова. — М.: Советская энциклопедия. 1983. Т. 1. С. 53.
6. Химический энциклопедический словарь / Под ред. И.Л. Кнунянца. — М.: Советская энциклопедия, 1983. С. 76.
7. Большая Советская энциклопедия. — М.: Советская энциклопедия. 1970. Т. 3. С. 359.
8. Большая медицинская энциклопедия. — М.: Советская энциклопедия. 1976. Т. 3. С. 179.
9. *Лучинин В.В.* Проблемы интеграции микро- и биотехнологии // Петербургский журнал электроники. 1996. Вып. 1 (10). С. 9–21.
10. *Гудвин Б.* Аналитическая физиология клеток и развивающихся организмов. — М.: Мир, 1979. — 257 с.
11. *Албертс Б.*, *Брей Д.*, *Льюис Дж.*, *Рэфф М.*, *Робертс К.*, *Уотсон Дж.* Молекулярная биология клетки. — М.: Мир, 1994. Т. 1. — 509 с.
12. *Стьюпер Э.*, *Бреггер У.*, *Джурс П.* Машинный анализ связи химической структуры и биологической активности. — М.: Мир, 1982. — 238 с.
13. *Дорфман В.Ф.* Мысль, заключенная в кристалле. — М.: Знание, 1986. — 208 с.
14. *Лучинин В.В.* Пространственно-временной полиморфизм и временная организация биологических систем // Труды Ленингр. общ-ва естествоиспытателей. 1988. Т. 87, вып. 1. С. 22–35.
15. *Броудай И.*, *Мерей Дж.* Физические основы микротехнологии. — М.: Мир, 1985. — 496 с.
16. *Симон Ж.*, *Андре Ж.-Ж.* Молекулярные полупроводники. Фотоэлектрические свойства и солнечные элементы. — М.: Мир, 1988. — 341 с.
17. *Гаряев П.П.* Волновой геном. — М.: Общественная польза, 1994. — 280 с.
18. *Агальцов А.М.*, *Гарячев П.П.*, *Горелик В.С.*, *Раматуллаев И.А.*, *Щеглов В.А.* Двухфотонно-возбуждаемая люминесценция в генетических структурах // Квантовая электроника. 1996. Вып. 23, № 2. С. 181–184.
19. *Карасев В.А.*, *Лучинин В.В.*, *Стефанов В.Е.* Как построить биочип // Биотехнология. 1993. № 2. С. 3–15.
20. *Karasev V.A.*, *Luchinin V.V.*, *Stefanov V.E.* A Model of Molecular Electronics Based on the Concept of Conjugated Ionic-Hydrogen Bond Systems // Adv. Mater. Opt. Electron. 1994. V. 4. P. 203–218.
21. *Carter F.L.* The molecular devices computer: point of departure for large scale cellular automata // Physica D. 1984. V. 10, № 1–2. P. 175–194.
22. *Галушкин А.И.*, *Иванов В.В.*, *Картамышев М.Г.*, *Симоров С.Н.*, *Черевков К.В.* Некоторые концептуальные вопросы развития нейрокомпьютеров // Успехи современной радиоэлектроники. 1997. Вып. 2. С. 3–10.

23. *Кальнин А.А.*, *Лучинин В.В.* Физические основы функциональной электроники на самоорганизующихся средах // Электронная промышленность. 1983. № 8. С. 6–11.
24. *Драчев А.Е.*, *Кальнин А.А.*, *Лучинин В.В.* Эффект восстановления моды коллективных движений в открытых системах с адаптивными неоднородностями // Журнал технической физики. 1993. Т. 63, вып. 2. С. 121–133.
25. *Драчев А.Е.*, *Кальнин А.А.*, *Лучинин В.В.* Обучаемая сеть на адаптивных магнитных элементах // Журнал технической физики. 1992. Т. 62, вып. 12. С. 139–145.
26. *Kohonon T.* Selt-organization and Associative Memory. — Berlin, Heidelberg, N. Y., Tokyo: Springer Verlag, 1984. — 255 p.
27. *Widrow B.* Self-organization Systems / Ed. by M.C. Yovits. — Washington: Spartian Books, 1962. — 435 p.
28. Введение в молекулярную электронику / Под ред. Н.С. Лидоренко и др. — М.: Энергоатомиздат, 1984. — 320 с.
29. *Николис Дж.* Динамика иерархических систем. Эволюционное представление. — М.: Мир, 1989. — 486 с.
30. *Медников Б.М.* Аксиомы биологии. — М.: Знание, 1982. — 136 с.
31. *Кольцов Н.К.* Организация клетки. — М.: Гостехиздат, 1936. — 200 с.
32. *Николис Г.*, *Пригожин И.* Самоорганизация в неравновесных системах. — М.: Мир, 1979. — 340 с.
33. *Карасев В.А.*, *Стефанов В.Е.*, *Курганов Б.И.* Надмолекулярные биоструктуры: организация, функционирование, происхождение // В кн.: Итоги науки и техники, сер. Биолог. химия. Т. 31. — М.: ВИНИТИ, 1989. — 199 с.
34. *Дорфман В.Ф.* О топологической разрешимости интегральных структур без совмещений // Микроэлектроника. 1975. Т. 4, вып. 3. С. 213–219.
35. *Ичас М.* Биологический код. — М. Мир, 1971. — 351 с.

Глава 2

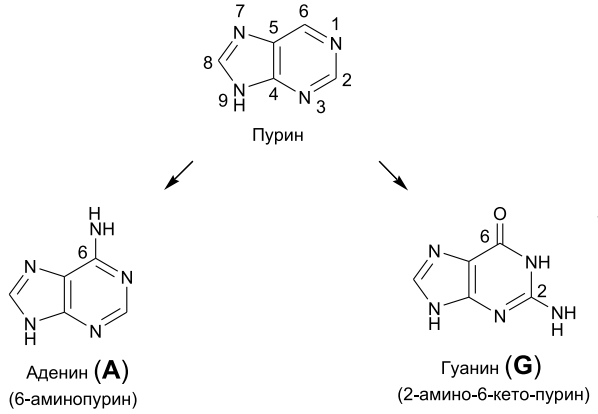
СТРОЕНИЕ БИОМОЛЕКУЛ И БИОПОЛИМЕРОВ

Для того, чтобы понимать язык биохимии, используемый в нашей книге, мы представим читателю основные сведения о структуре наиболее важных биомолекул и главных типов биополимеров — нуклеиновых кислот и белков.

Отметим две особенности биополимеров. Первая состоит в том, что они представляют собой линейные структуры, которые от начала до конца не имеют разветвлений основной цепи. Вторая особенность — это цепные полимеры, то есть они состоят из отдельных звеньев (нуклеотидов, аминокислот), связанных с помощью одинаковых групп (сахаро-фосфатных, пептидных) в единую цепь. Свойство линейности — это сугубо биологическое свойство, и, как мы увидим, связано оно с тем, что биополимеры обладают способностью к самоорганизации и являются материальными носителями генетического кода.

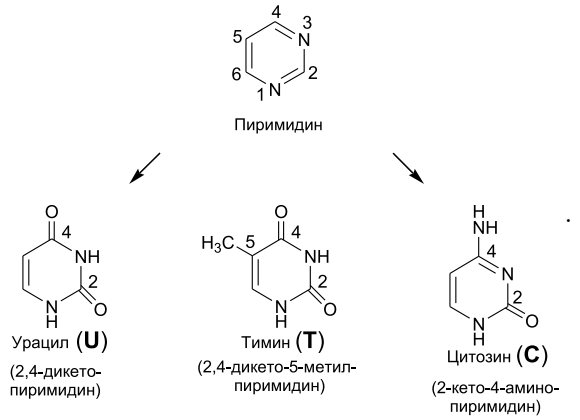
2.1. Нуклеиновые кислоты

2.1.1. Строение цепей нуклеиновых кислот. Термин «нуклеиновые кислоты» происходит от латинского названия клеточного ядра — «nucleus». Основной тип нуклеиновых кислот — дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК), которая находится в ядре. Цепь ДНК состоит из сахаро-фосфатного остова, (в качестве сахара используется дезоксирибоза), к углеводным остаткам которого присоединены в различном порядке четыре типа азотистых оснований — аденин (обозначают буквой A), гуанин (латинское G), тимин (T) и цитозин (C) [1]. Аденин и гуанин являются молекулами, состоящими из двух объединенных циклов — пятичленного и шестичленного. Они происходят от молекул пурина, поэтому их называют пуриновыми основаниями (схема 2.1).



(2.1)

Тимин и цитозин являются производными пиримидина и относятся к классу пиримидиновых оснований (схема 2.2).



(2.2)

Структура фрагмента сахаро-фосфатного остова, состоящего из трех звеньев, показана на рис. 2.1, *а*. Отдельное звено этой цепи, называемое нуклеотидом, включает азотистое основание, дезоксирибозу и фосфатную группу (рис. 2.1, *б*). Показанный на

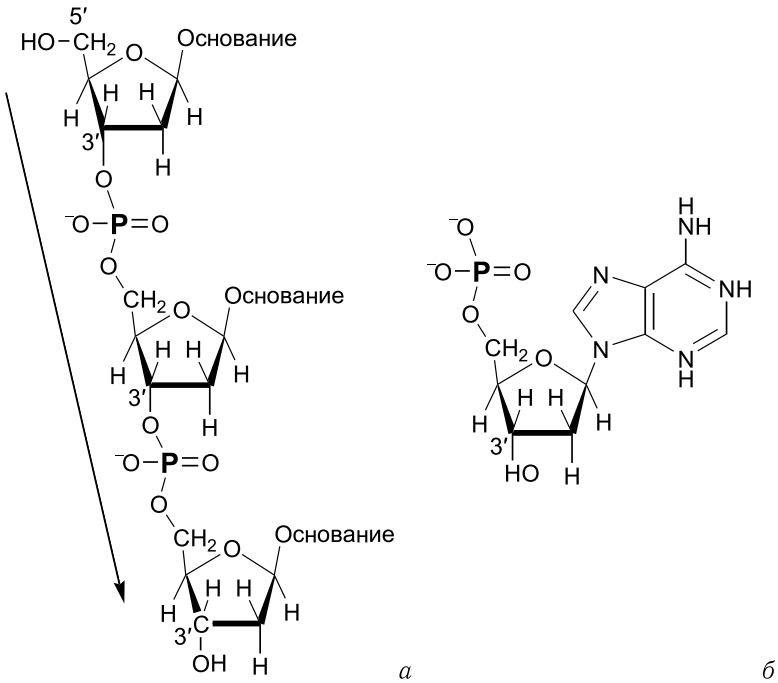


Рис. 2.1. Структура сахаро-фосфатного остова полинуклеотидной цепи (*а*) и строение мононуклеотида (*б*)

рисунке нуклеотид можно назвать аденинмононуклеотидом. Фрагменты, состоящие из несколько звеньев, именуют олигонуклеотидами (два звена — динуклеотид, три

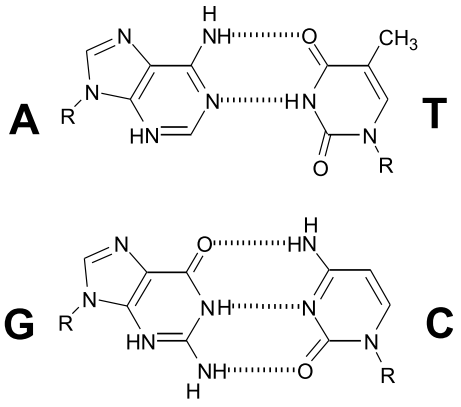
звена — тринуклеотид и т. д.). Цепь, состоящую из нескольких звеньев, называют олигонуклеотидом, а из многих звеньев — полинуклеотидной цепью. Как показано на рисунке, цепь имеет направление: она начинается с 5′ C–OH-группы дезоксирибозы, именуемой как 5′-конец и заканчивается 3′C–OH-группой на 3′-конце.

Поскольку специфичность ДНК придают азотистые основания, то информацию о последовательности азотистых оснований в цепи ДНК записывают с помощью четырехбуквенного алфавита, составленного из первых букв названий этих оснований (схема 2.3):

$$5'\,\ldots \mathbf{A\,C\,G\,T\,C\,A\,T\,T\,G\,C\,A\,A} \ldots\, 3'. \qquad (2.3)$$

2.1.2. Классификация и надмолекулярная структура нуклеиновых кислот. Кроме ДНК в клетках присутствуют также рибонуклеиновые кислоты (РНК) разных видов — информационные, рибосомные, транспортные. В отличие от ДНК, вместо тимина в них находится урацил (U), являющийся аналогом тимина (у него нет метильной группы), а вместо дезоксирибозы присутствует сахар рибоза.

Напомним, что ДНК существует не в виде одной, а в виде двух спирально закрученных комплементарных (дополнительных) цепей. Модель структуры ДНК и правила комплементарности азотистых оснований впервые предложили Д. Уотсон и Ф. Крик [2]. Суть правил комплементарности состоит в следующем. Внутри двойной спирали аденин образует две водородных связи с тимином, а гуанин — три водородных связи с цитозином (схема 2.4):



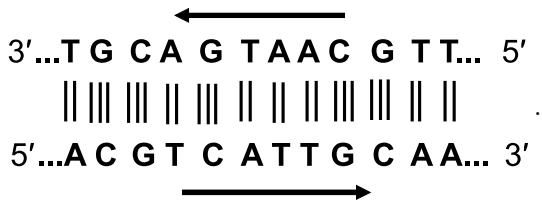
(2.4)

Условно их можно обозначить так (схема 2.5):

$$\mathrm{A}{=}\mathrm{T} \qquad\qquad \mathrm{G}{\equiv}\mathrm{C}\,. \qquad (2.5)$$

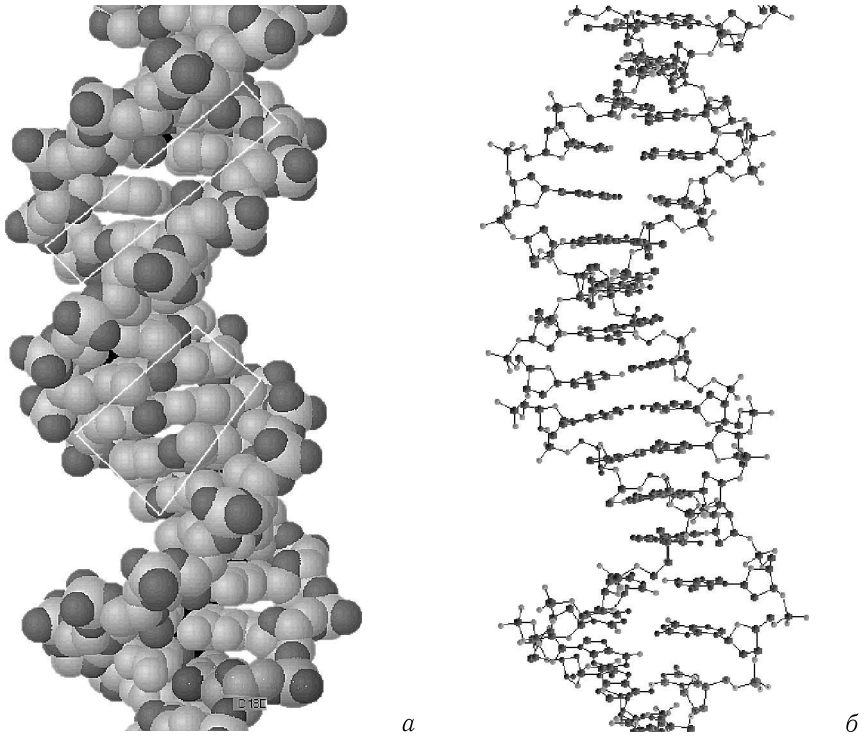
Две черты означают наличие двух водородных связей в паре A–T, а три черты — трех водородных связей в паре G–C. Следуя правилам комплементарности, легко

достроить вторую цепь ДНК в приведенной выше последовательности (схема 2.6):



(2.6)

Отметим, что цепи в двойной спирали ДНК имеют противоположной направление (показано стрелками), т. е. они антипараллельны. Общий вид фрагмента двойной спирали ДНК, полученный с помощью программы PROTEIN 3D при разных формах представления, показан на рис. 2.2. На рисунке видно, что азотистые основания, образующие комплементарные пары, локализованы внутри спирали, а сахаро-фосфатный остов расположен на поверхности. Имеется два типа углублений между ними: желоб с большим расстоянием (в центральной части рисунка) — называют большой бороздкой, а с меньшим расстоянием (выше большой бороздки) называют малой бороздкой.



а *б*

Рис. 2.2. Общий вид структуры двойной спирали ДНК (использован файл 1b72 из Protein Data Bank) [3]: *а* — модель ван-дер-ваальсовых радиусов; *б* — шаро-стержневая модель

Основные параметры двойной спирали: диаметр — 20 Å, расстояние между соседними основаниями вдоль оси спирали — 3,4 Å, угол поворота — 36°. На один виток спирали каждой из цепей приходится 10 нуклеотидов, что соответствует 34 Å.

2.1.3. Значение принципа комплементарности. Принцип комплементарности имеет фундаментальное значение для молекулярной биологии. На нем построен механизм самоудвоения ДНК — редупликации, обеспечивающий передачу наследственной информации в момент деления клеток. На протяжении жизни клетки используют этот принцип при считывании с отдельных фрагментов ДНК копий, в виде информационных РНК (и-РНК) — процесс транскрипции. В этом процессе в качестве матрицы обычно служит лишь одна из цепей ДНК (схема 2.7):

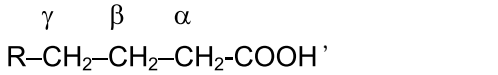


(2.7)

Наконец, третий важный механизм, где реализуется принцип комплементарности — это синтез белка. Подчеркнем, что для нуклеиновых кислот именно способность к комплементарному связыванию определяет структуру этих молекул в виде двойной спирали. Одинарные молекулы имеют беспорядочную структуру. Назовем эту способность молекулы ДНК связностью. Для нуклеиновых кислот свойство связности принадлежит всей последовательности нуклеотидов и проявляется в том случае, если с этой последовательностью встречается комплементарная к исходной цепь — тогда и возникает двухспиральная структура. Белки также обладают свойством связности, но проявляется оно совсем по-другому.

2.2. Белки

2.2.1. Строение и номенклатура аминокислот. Цепи белков состоят из отдельных звеньев — аминокислот, связанных пептидной связью [4]. Все аминокислоты имеют единый тип строения. Название *аминокислота* указывает на то, что это органическая кислота, содержащая аминогруппу. Выпишем общую формулу кислоты (схема 2.8):

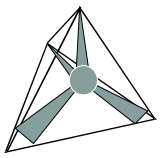


(2.8)

где R — какие-либо боковые цепи, COOH — карбоксильная группа, CH_2-группы — фрагменты углеводородной цепи.

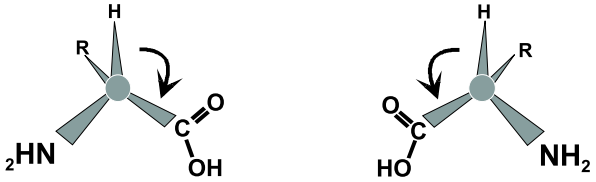
Согласно Женевской номенклатуре, CH_2-группы, идущие после карбоксильной группы, обозначают как α, β, γ. Соответственно, аминокислоты могут содержать аминогруппу в α, β, γ и т. д. положениях. Все аминокислоты, входящие в белки, являются только α-аминокислотами.

Связи атомы углерода, в пространстве имеют вид тетраэдра (схема 2.9):



(2.9)

При этом, как видно на схеме, две связи направлены в сторону от нас (заканчиваются острием), а две — к нам (острием начинаются от атома углерода). Последовательность присоединения заместителей к атому углерода может быть осуществлена в виде двух вариантов (схема 2.10):

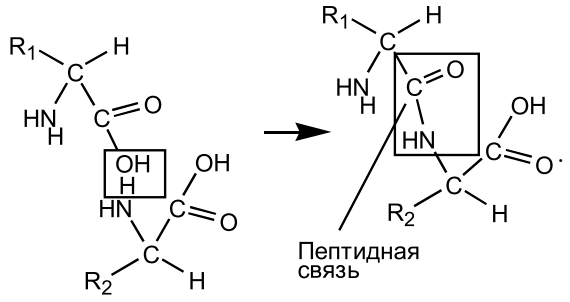


(2.10)

L-конфигурация D-конфигурация

Слева, на структуре, обозначенной как L-конфигурация, заместители COOH, NH_2, H, R расположены по часовой стрелке, а справа (D-конфигурация) — против часовой стрелки. По своим химическим свойствам эти две структуры практически одинаковы. В пространстве, однако, эти две конфигурации являются зеркальным отражением. Напомним, что наличие двух типов зеркальных изомеров носит название хиральность (от греческого слова *хира*, рука) Все белки состоят из α-аминокислот, имеющих L-конфигурацию, т. е. являются хирально чистыми L-изомерами.

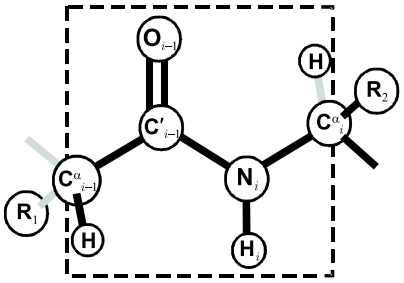
2.2.2. Пептидная связь. Все природные α-аминокислоты обладают способностью вступать между собой в следующую химическую реакцию (схема 2.11):



(2.11)

Результатом реакции является образование пептидной связи. Группу атомов, входящих в пептидную связь, можно записать как «HN–C=O-группа». В клетках процесс синтеза белка, который сопровождается формированием пептидной связи, происходит при участии клеточных структур. При этом аминокислоты присоединяются со стороны карбоксильной группы, поэтому направление белковой цепи задают от аминогруппы (N-конец) к свободной карбоксильной группой (C-конец).

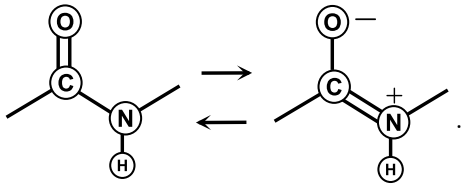
Рассмотрим особенности пептидной связи более подробно (схема 2.12):



(2.12)

На этой схеме все шесть атомов, имеющих отношение к образованию пептидной связи (C^{α}_{i}, N_i, H_i, C'_{i-1}, O_{i-1}, C^{α}_{i-1}), как показали структурные данные [5], лежат в одной плоскости (выделена пунктиром в прямоугольнике). Боковые цепи аминокислот R_1 и R_2 находятся в *транс*-положении, т. е. по разные стороны от плоскости. *Транс*-положение является характерным для природных белков.

Пептидная связь (HN–C=O-группа) может вращаться между двумя α-углеродными атомами (C^{α}_{i} и C^{α}_{i-1}) как единое целое. Объяснение причины жесткости пептидной связи было предложено Л. Полингом на основе теории резонанса [6]. Эта теория учитывает способность двойных связей перемещаться, что приводит к существованию в структурах нескольких резонансных форм. Для пептидной связи это выглядит так (схема 2.13):



60% 40%

(2.13)

Из схемы видно, что двойная связь в HN–C=O-группе перемещается, как бы «резонирует». Экспериментальные данные показывают [5], что в пептидной связи двойная связь на 60% находится в области группы C–O, а на 40% — в связи C–N. Как известно, вокруг одинарных связей в органических молекулах могут происходить различные вращения. Двойные же связи, в отличие от одинарных являются жесткими, вращения вокруг них не происходят. Поскольку в пептидной связи двойная связь распределена между C–O и C–N-группами, то жесткой оказывается вся HN–C=O-группа. Поэтому она вращается вся целиком. Расстояние между C^{α}_{i-1} и C^{α}_{i} есть величина более менее постоянная и составляет примерно 3,6 Å.

Вследствие жесткой плоской конфигурации пептидных связей конформацию белков можно описать с помощью двух двугранных углов, расположенных справа и слева от α-углеродных атомов (так называемые углы φ_i ψ_i). Расчеты показывают, что цепь, построенная из α-аминокислот, может принимать довольной ограниченный набор конформаций [7].

Цепь белка, содержащая только пептидые связи и α-углеродные атомы, носит название α-углеродного скелета. На рис. 2.3 показано, как выглядит фраг-

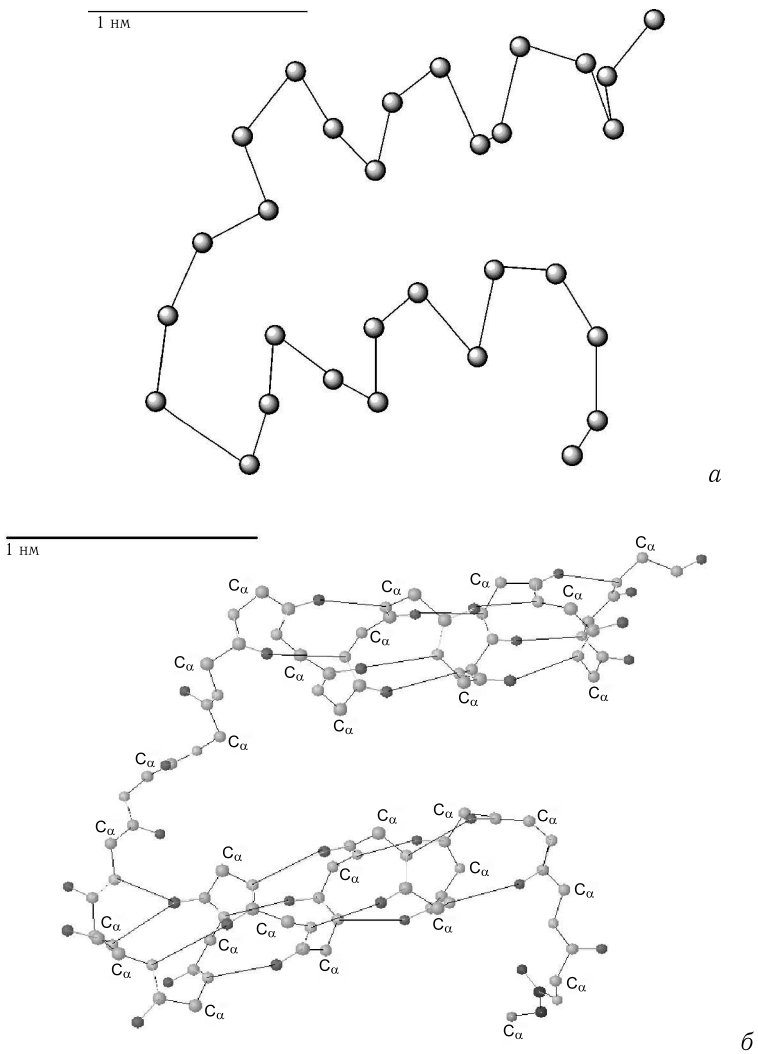
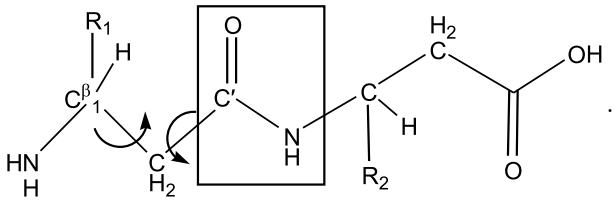


Рис. 2.3. α-углеродный скелет фрагмента с-фикоцианина (файл 1cpc, с 1 по 32 аминокислоту) [8]: *а* —только C_α-атомы; *б* — C_α-атомы и пептидные связи. Видны водородные связи, идущие вдоль спиралей

мент α-углеродного скелета, визуализируемый с помощью программы PROTEIN 3D. На рис. 2.3, *а* показаны только α-углеродные атомы, а на рис. 2.3, *б* — как C_α-атомы, так и пептидные связи (показан фрагмент белка с-фикоцианина с двумя участками спиральной конформации).

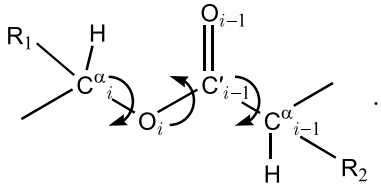
2.2.3. Причина предпочтения α-аминокислот и пептидной связи в биополимерах. Рассмотрим продукт реакции двух β-аминокислот (схема 2.14):



(2.14)

Появление CH_2-группы между атомами углерода $C_{\beta 1}$ и C' приводит к дополнительной возможности вращения вокруг связей $C_{\beta 1}–CH_2$ и $CH_2–C'$. Конформация такой связи становится практически неопределенной. Ситуация с γ-аминокислотами аналогична. Таким образом, становится ясны преимущества α-аминокислот. Именно α-аминокислоты — единственный тип аминокислот, имеющий при формировании полипептидной цепи набор конформационных состояний, поддающихся регулированию.

Теперь сравним особенности пептидной и сложноэфирной связи. Последняя образуется при взаимодействии карбоксильной группой и C–OH-группой оксикислоты (схема 2.15):



(2.15)

Как мы рассмотрели выше, одной из особенностей пептидной связи является способность двойной связи в HN–C=O-группе к резонансу, что обеспечивает жесткость этой группы. Отличием карбоксильной группы от пептидной является то, что в O–C=O-группе явление резонанса практически отсутствует (двойная связь локализована между $C'_{i-1}–O_{i-1}$). Это означает, что все три связи $C^{\alpha}{}_{i-1}–C'_{i-1}$, $C'–O_i$ и $O_i–C^{\alpha}{}_i$ свободно вращаются, приводя к бесчисленному разнообразию конформаций.

Второй особенностью пептидной связи является ее способность участвовать в стабилизации вторичной структуры белка, например, показанной на рис. 2.3 спиральной конформации за счет образования водородной связи между двумя HN–C=O-группами (рис. 2.4, *а*).



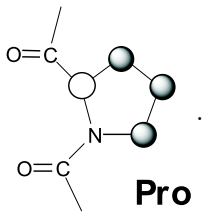
Рис. 2.4. Возможности пептидной (*а*) и сложноэфирной (*б*) связей в фиксации спиральной конформации полимера: α-углеродные атомы — серые шарики

На рисунке рис. 2.4, *а* группа $O_{i-1}=C–N_iH$ образует водородную связь с группой $O_{i-4}=C–N_{i-3}H$, фиксируя при этом 4-х-звенный фрагмент полимера. В то же время, труппа $O_{i-1}=C–O_i$ подобную конформацию фиксировать не может (рис. 2.4, *б*).

Способность полипептидной цепи фиксировать коформацию цепи за счет водородных связей HN–C=O-групп мы будем в дальнейшем называть свойством связности. Таким образом, можно считать, что основная цепь белка, как и полинуклеотидная цепь, обладает связностью. Только группы способные к образованию водородной связи, придают цепи полимера свойство связности.

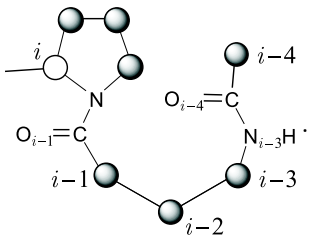
2.2.4. Канонический набор аминокислот. В состав белков входит 20 типов аминокислот, называемых каноническими. Именно они кодируются генетическим кодом. Модификации аминокислот происходят уже после синтеза белков. Каждая аминокислота имеет свое тривиальное название и название, присвоенное в соответствии с правилами номенклатуры. Мы будем приводить только тривиальные наименования и их сокращенные трехбуквенные обозначения, в английском варианте, поскольку сейчас они общеприняты. Будет приведена близкая к традиционной классификация аминокислот [4]. Однако, поскольку все аминокислоты, как правило, находятся в структуре белка, то они будут изображены как фрагменты полипептидной цепи. Некоторые функциональные свойства аминокислот становятся при этом яснее.

1. Пролин (схема 2.16):



(2.16)

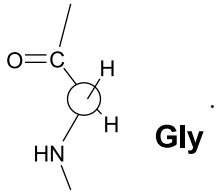
Пролин является в некотором смысле исключением. Его боковая цепь, состоящая из CH_2-групп (далее CH_2- и CH_3-группы мы будем обозначать серыми шарами), образует кольцо, в которое входит аминогруппа. Поэтому химически он относится не к амино-, а к иминокислотам. Это приводит к тому, что в составе полипептидной цепи атом азота N–C=O-группы не обладает способностью образовывать водородную связь. Если эта аминокислота будет находиться в i-м положении, то образование α-спирального цикла с группой O_{i-4}=C–N_{i-3}H будет невозможно (схема 2.17):



(2.17)

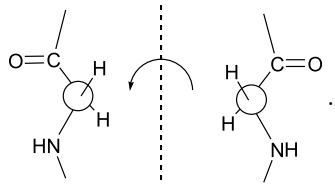
По этой причине пролин прерывает α-спирали.

2. Глицин (схема 2.18):



(2.18)

Заместителем у α-углеродного атома (белый кружок, далее будет изображаться без атомов водорода) в данной аминокислоте является атом водорода. Вследствие этого глицин является также исключением: у α-углеродного атома два одинаковых заместителя — атомы водорода. Отразим эту молекулу в зеркале (схема 2.19):

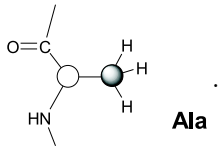


(2.19)

Если теперь правую молекулу вращать относительно вертикальной оси, то в результате обе молекулы полностью совместятся. Это означает, что его α-углеродный атом не является хиральным. Глицин является единственной аминокислотой, не обладающей свойством хиральности.

Еще одной особенностью глицина является то, что углеродный атом глицина содержит в качестве заместителей только атомы водорода, что придает его связям возможность принимать необычные углы и приводит к изгибам основной цепи.

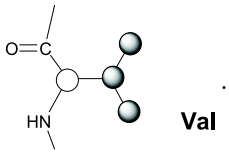
3. Аланин (схема 2.20):



(2.20)

У аланина самая короткая боковая цепь — в качестве заместителя при α-углеродном атоме находится метильная (CH_3–) группа. На этой группе специально показаны атомы водорода, так как многие боковые цепи аминокислот можно рассматривать как результат замещения этих атомов на другие функциональные группы

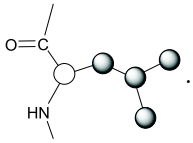
4. Валин (схема 2.21):



(2.21)

Валин получается путем замены в двух атомов водорода метильной группы аланина на две метильные группы.

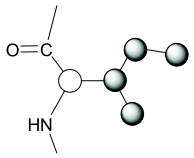
5. Лейцин (схема 2.22):



(2.22)

Лейцин структурно очень похож на валин, но между разветвлением и α-углеродным атомом находится дополнительная CH_2-группа. В принципе, эти две аминокислоты похожи друг на друга и по физическим свойствам.

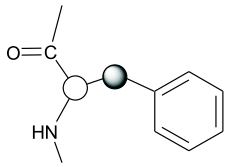
6. Изолейцин (схема 2.23):



(2.23)

Его можно также рассматривать как результат замещения двух атомов водорода в метильной группе аланина, но, в отличие от валина, вместо второй метильной группы в качестве заместителя служит — этильная ($-CH_2-CH_3$) группировка. Если в изолейцине поменять местами CH_3-группу этильной ветви и α-углеродный атом, то получим его близкий аналог Leu.

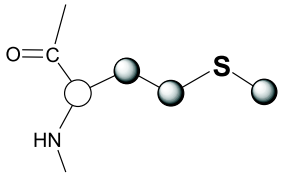
7. Фенилаланин (схема 2.24):



(2.24)

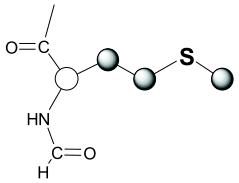
Снова сопоставим эту аминокислоту с аланином. Если один из атомов водорода в метильной группе аланина заменить на циклический шестичленный радикал фенил, то в результате получается фенилаланин.

8. Метионин (схема 2.25):



(2.25)

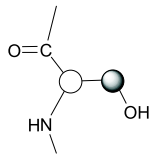
Боковая цепь метионина не имеет разветвлений. На конце цепи находится атом серы, связанный с метильной группой. По физическим свойствам похож на неполярные аминокислоты, однако атом серы может образовывать водородные связи (например, с C=C–OH-группой тирозина). Кроме того, с этой аминокислоты при биосинтезе белка начинается синтез полипептидной цепи. В этом случае его свободная $C-NH_2$-группа (N-конец белка) связана с остатком муравьиного альдегида и переходит в HN–C=O-группу. Такой измененный метионин называют формил-метионином (fMet) (схема 2.26):



(2.26)

Аминокислоты — Pro, Ala, Val, Leu, Ile, Phe, Met содержат гидрофобные боковые цепи и образуют группу неполярных аминокислот.

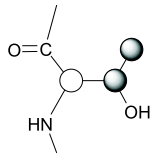
9. Серин (схема 2.27):



Ser . (2.27)

Структуру серина можно получить путем замещения атома водорода в аланине на –OH-группу.

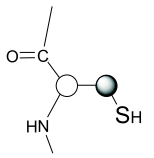
10. Треонин (схема 2.28):



Thr . (2.28)

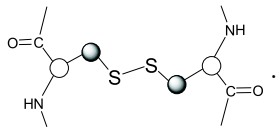
Близкий аналог серина, у которого добавлена еще одна метильная группа. Внешне похож на валин. Здесь мы снова встречаемся с дублированием функциональных свойств у аминокислот (сравните: Leu и Ile).

11. Цистеин (схема 2.29):



Cys . (2.29)

Также аналог серина, однако у цистеина вместо C–OH-группы находится C–SH-группа. Особенность цистеина в белках: два цистеина из различных участков цепи могут образовать ковалентную связь, содержащую сдвоенные атомы серы (схема 2.30):

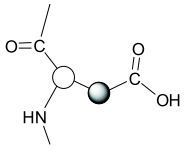


. (2.30)

Эти, так называемые, дисульфидные связи, имеют важное значение в стабилизации надмолекулярной структуры белка.

Аминокислоты Ser, Thr и Cys относят к слабо полярным, но их боковые цепи могут образовывать водородные связи.

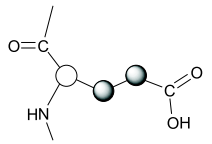
12. Аспарагиновая кислота (схема 2.31):



Asp . (2.31)

Ее можно представить как продукт замещения одного атома водорода в метильной группе аланина на карбоксильную HO–C=O-группу, проявляющую в растворе кислотные свойства.

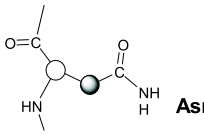
13. Глютаминовая кислота (схема 2.32):



(2.32)

Близкий аналог аспарагиновой кислоты. Ее HO–C=O-группа отстоит от основной цепи на одну CH_2-группу дальше, чем в аспарагиновой кислоте.

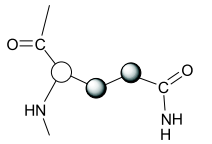
14. Аспарагин (схема 2.33):



(2.33)

Это амид аспарагиновой кислоты, содержит H_2N–C=O-группу.

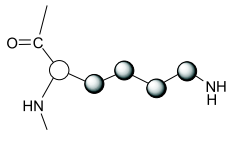
15. Глютамин (схема 2.34):



(2.34)

Амид глютаминовой кислоты, также содержит H_2N–C=O-группу.

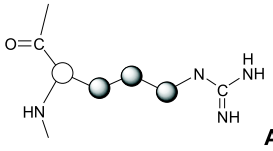
16. Лизин (схема 2.35):



(2.35)

Имеет длинную неполярную цепь, состоящую из четырех CH_2-групп. Содержит на конце C–NH_2-группу, проявляет щелочные свойства.

17. Аргинин (схема 2.36):



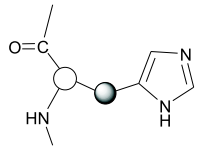
(2.36)

Имеет на конце гуанидиновую группировку — (группы H_2N–C=N), проявляющую, также как и лизин, основные свойства.

Три пары аминокислот Asp и Glu, Asn и Gln, а также Lys и Arg характеризуются рядом общих свойств. Во первых, все они представляют собой близкие по свойствам пары — как и предыдущие Val и Leu, а также Ser и Thr. Во вторых, все эти аминокислоты способны к образованию водородных связей, как между собой, так и с основной цепью белка. В третьих, все они, кроме лизина, имеют терминальные группировки с подвижной двойной связью. Наконец, в четвертых, пары Asp, Glu

и Lys, Arg обладают противоположными свойствами. Первая пара преимущественно отдает протоны (протонодоноры), а вторая пара — захватывает протоны (протоноакцепторы).

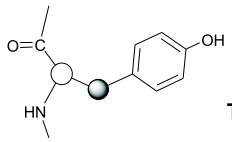
18. Гистидин (схема 2.37):



His . (2.37)

Аналог аланина, у которого имидазольная группа замещает один водород. Проявляет щелочные свойства, образует водородные связи.

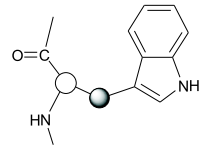
19. Тирозин (схема 2.38):



Tyr . (2.38)

Еще один аналог аланина, в котором атом водорода замещен на оксифенильную группу. Его C=C–OH-группа проявляет свойства слабой кислоты, образует водородные связи.

20. Триптофан (схема 2.39):



Trp . (2.39)

Эту аминокислоту также можно рассматривать в качестве аналога аланина, в котором атом водорода замещен на индольную группировку, состоящую из двух циклов — пятичленного и шестичленного. Проявляет основные свойства, атом водорода при атоме азота способен к образованию водородных связей.

Все аминокислоты, начиная с девятой, могут образовывать водородные связи с другими полярными группами. Формирование таких связей будет приводить к фиксации отдельных фрагментов полипептидной цепи белка. Мы будем называть эту способность свойством связности. Таким образом, в белках свойством связности обладает как полипептидная цепь, так и часть боковых цепей аминокислот.

Общий вид фрагмента цепи белка, с использованием трехбуквенных обозначений аминокислот, выглядит так (схема 2.40):



. (2.40)

В приведенном фрагменте N-конец, с которого начинается синтез белка, находится справа. Цепь удлиняется справа налево. Жирным шрифтом выделены неполярные аминокислоты, обычным — полярные аминокислоты.

2.2.5. Механизм биосинтеза белка. В процессе биосинтеза белка осуществляется перевод, трансляция, информации о белке, записанной на и-РНК в виде последовательности триплетов, в полипептидную цепь, формирующую далее белковую структуру. Биосинтез белка является центральным механизмом, в котором сходятся все элементы отношений кодирования: информационная РНК (и-РНК), транспортные РНК (т-РНК), аминокислоты и готовый белок [1]. Схематически процесс синтеза белка показан на рис. 2.5.

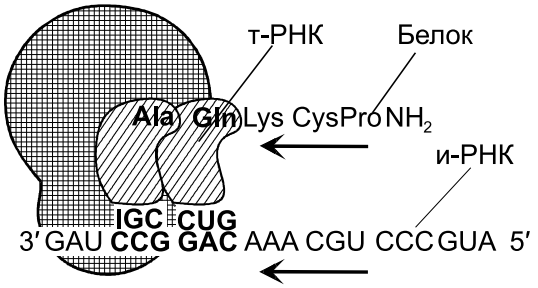


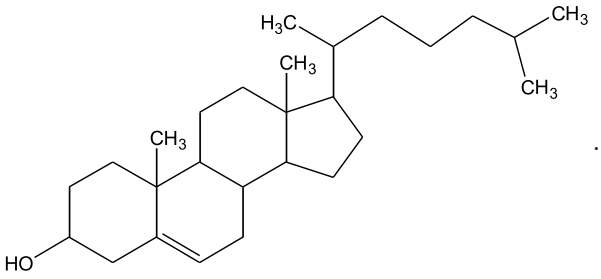
Рис. 2.5. Принципиальная схема биосинтеза белка

Главную роль в преобразовании информации с 4-х-буквенного алфавита в 20ти-буквенный играют молекулы адаптеров — т-РНК (на рисунке выделены косой штиховкой). В нижней части этих молекул находится антикодон — тройка оснований, которая на основе принципа комплементарности узнает триплеты (кодоны), расположенные на и-РНК. В верхней части к т-РНК присоединены с помощью ферментов аминокислоты, соответствующие узнаваемым триплетам. На рисунке видно, что процесс движения рибосомы (заштрихована в клетку) вдоль и-РНК осуществляется в направлении стрелки от 5′-конца к 3′-концу. На каком-то этапе при участии рибосом на и-РНК садятся молекулы т-РНК, которые своими антикодонами узнают комплементарные кодоны. Аминокислоты, которые переносятся молекулами т-РНК, с помощью ферментов соединяются в белковую цепь, растущую от N-конца (показано стрелкой). Начало синтеза полипептидной цепи инициируется триплетом AUG (на и-РНК он первый со стороны 5′-конца, читается справа налево), который кодирует формилметионин (fMet). Сигналом конца биосинтеза является триплет UAG (на и-РНК он последний, рядом с 3′-концом) и ряд других триплетов, называемых Стоп-кодонами. Для них т-РНК отсутствуют. Обратим ваше внимание на то, что цепь белка и и-РНК в процессе синтеза имеют одинаковое направление (коллинеарны). При этом только линейный характер этих цепей обеспечивает саму возможность синтеза белка. Процесс формирования структуры белка, как стало ясно в последнее время, происходит чаще всего уже в момент его синтеза [9].

2.3. Липиды

Молекулы липидов относятся к числу наиболее важных компонентов структуры биологических мембран. Химически они относятся к разным классам веществ. В процессе дальнейшего изложения будут рассмотрены, в основном, два типа липидов: холестерин и фосфолипиды [4].

2.3.1. Холестерин. Структура молекулы состоит из циклопентанпергидрофенантренового ядра (ЦПФ-ядро) и шестичленного неполярного фрагмента. В ЦПФ-ядре, в третьем положении находится спиртовая C–OH-группа, а в положении 5–6 — двойная связь (схема 2.41):

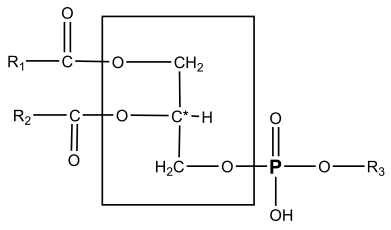


. (2.41)

Холестерин снижает степень жидкостности биологических мембран животных. В растениях также имеется аналог холестерина — ситостерин. На основе холестерина синтезируется пять классов стероидных гормонов: прогестагены, глюкокортикоиды, минералокортикоиды, андрогены и эстрогены. Кроме того, производными холестериная являются желчные кислоты — природные детергенты, а также витамин D (холекальциферол).

2.3.2. Фосфолипиды. Молекулы фосфолипидов, наряду с холестерином, также являются важнейшим компонентом биомембран и участвуют в процессах, связанных с переносом электронов [10].

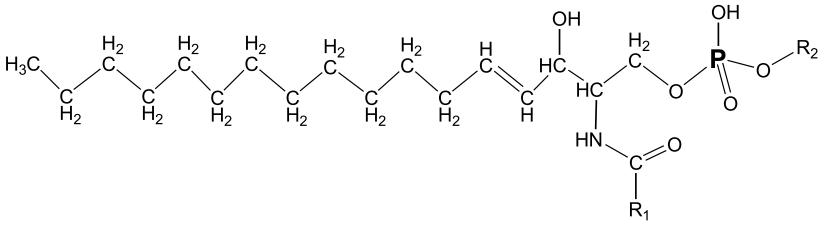
Существует два типа молекул фосфолипидов — глицерофосфолипиды и сфинозинфосфолипиды. Основой построения глицерофосфолипидов служит трехатомный спирт глицерин (схема 2.42):



. (2.42)

Присоединение двух жирных кислот (R_1 и R_2), фосфатной группы и азотистых оснований (R_3) приводит к появлению в молекуле глицерина (в прямоугольнике) асимметрического атома углерода (отмечен звездочкой). Природный глицерин относится к D-типу.

Сфингофосфолипиды содержат в своем составе другой спирт, сфингозин, который является высокомолекулярным аминоспиртом (схема 2.43).



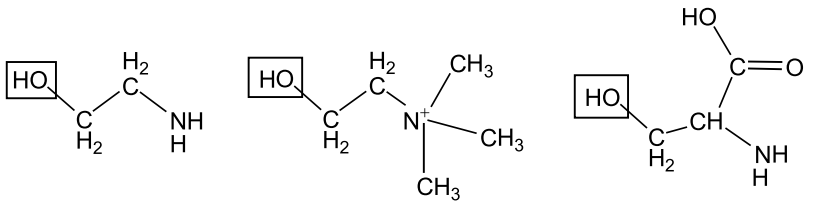
(2.43)

Он содержит две спиртовых C–OH-группы. Одна из них является свободной, а ко второй, через фосфатную группу, присоединяются азотистые основания (R_2) сфингофосфолипиды или, напрямую, углеводные остатки (в гликолипидах). К аминогруппе, пептидной связью (HN–C=O-группа), присоединен остаток жирной кислоты (R_1).

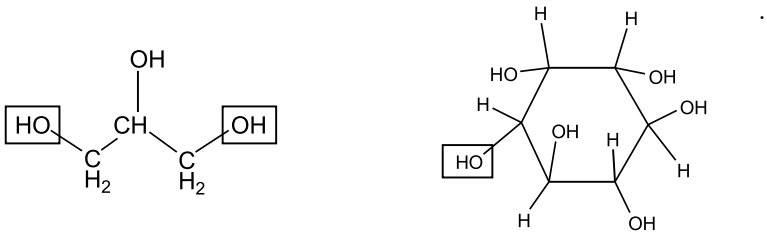
В состав фосфолипидов входят два типа жирных кислот — насыщенные, занимающие в глицеролипидах, как правило, позицию R_1(положение 1 или α-положение в молекуле глицерина), и ненасыщенные, в позиции R_2 (положение 2 или β-положение). Примеры насыщенных и ненасыщенных жирных кислот приведены на в табл. 2.1. Необходимо отметить, что углеводородные остатки в природных ненасыщенных жирных кислотах находятся в цис-положении относительно двойной связи, т. е. по одну сторону, вследствие чего структура этих жирных кислот сильно искривлена, что видно из приведенных формул.

В качестве заместителей к фосфатной группе глицеролипидов (R_3) и сфинголипидов (R_2) присоединяются азотистые основания — этаноламин, холин и аминокислота серин, а также спирты — глицерол и инозитол.

Группировки, которыми они связаны с фосфатной группой, заключены в прямоугольники (схема 2.44):



Этаноламин Холин Серин

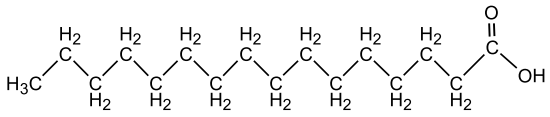
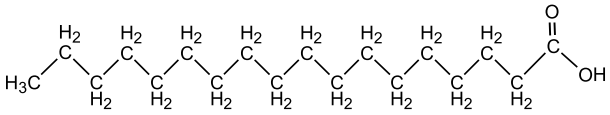
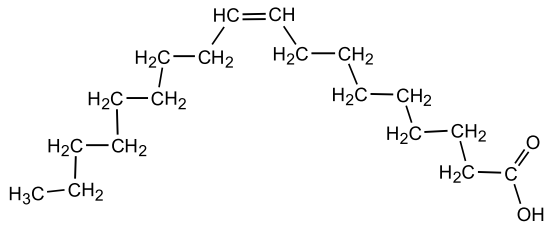
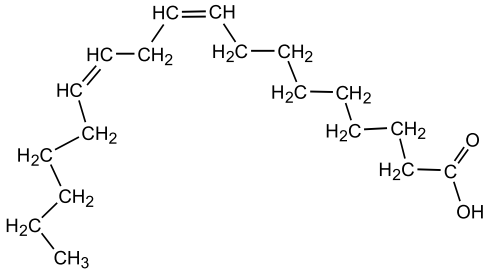


Глицерол Инозитол

(2.44)

Таблица 2.1

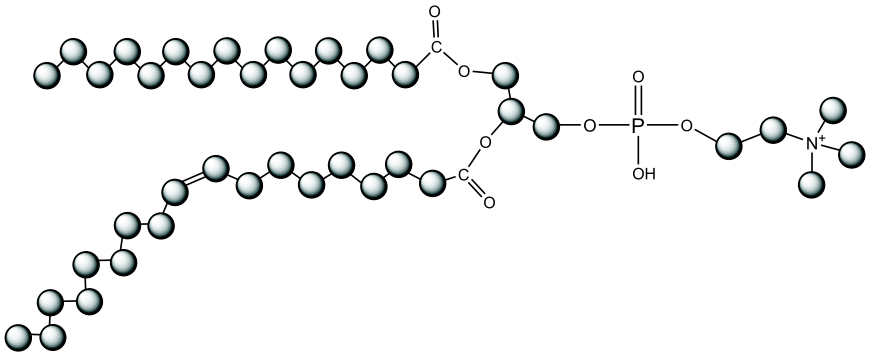
Жирные кислоты, встречающиеся в составе фосфолипидов

Название	Число С-атомов и двойных связей	Химическая формула
Насыщенные жирные кислоты		
Пальмитиновая	C_{16}	
Стеариновая	C_{18}	
Ненасыщенные жирные кислоты		
Олеиновая	$C_{18:1}$	
Линолевая	$C_{18:2}$	

Отметим, что остаток глицерола может присоединяться как к одной фосфатной группе, так и к двум. В последнем случае этот тип фосфолипидов называется кардиолипином.

Фосфолипиды имеют сложную номенклатуру названий. В упрощенном виде в название входит слово фосфатидил- (остаток состоящий из глицерина, жирных кислот и фосфатной группы) и заместителя при фосфатной группе, например, фосфатидилэтаноламин, фосфатилхолин и т. д. На схеме 2.45 показана структура молекулы

1-пальмитоил-2-олеоилфосфатидилхолина, в которой CH-, CH_2- и CH_3-группы изображены в виде серых шаров.



. (2.45)

Детали поведения фосфолипидов в водных растворах, а также в гидрофобной среде будут изложены в главе, посвященной мембранным структурам (гл. 11). Структура других биомолекул будет приведена в ходе изложения в тексте.

Литература к главе 2

1. *Страйер Л.* Биохимия. В 3-х томах / Пер. с англ. — М.: Мир, 1985. Т. 3. — 397 с.
2. *Watson J.D.*, *Crick F.H.C.* Molecular structure of nucleic acid. A structure for deoxyribose nucleic acid // Nature. 1953. V. 171. P. 737–738.
3. *Piper D.E.*, *Batchelor A.H.*, *Chang C.-P.*, *Cleary M.L.*, *Wolfberger C.* Structure of a hoxb1-pbx1 heterodimer bound to DNA: role of the hexapeptide and a fourth homeodomain helix in complex formation // Cell (Cambridge, Mass.). 1999. V. 96. P. 587–597.
4. *Страйер Л.* Биохимия. В 3-х томах / Пер. с англ. — М.: Мир, 1984. Т. 1. — 232 с.
5. *Pauling L.*, *Corey R.B.*, *Branson H.R.* The structure of proteins. Two hydrogen-bonded helical configurations of the polypeptide chain // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1951. V. 37. P. 205–211.
6. *Pauling L.* The Nature of the Chemical Bond / 3rd ed. Ithaca. — N. Y.: Cornell Univ. Press, 1960. — 644 p.
7. *Шульц Г.*, *Ширмер Р.* Принципы структурной организации белков / Пер. с англ. — М.: Мир, 1982. — 354 с.
8. *Duerring M.*, *Schmidt G.B.*, *Huber R.* Isolation, crystallization, crystal structure analysis and refinement of constitutive C-phycocyanin from the chromatically adapting Cyanobacterium fremyella diplosiphon at 1,66 angstroms resolution // J. Mol. Biol. 1991. V. 217. P. 577–592.
9. *Kolb V.A.*, *Makeyev E.V.*, *Spirin A.S.* Co-translational folding of an eukaryotic multidomain protein in a prokaryotic translation system // J. Biol. Chem. 2000. V. 275. P. 16597–601.
10. *Schagger H.*, *Hagen T.*, *Roth B.*, *Brandt U.*, *Link T.A.*, *von Jagow G.* Phospholipid specificity of bovine heart bc1 complex // Eur. J. Biochem. 1990. V. 190. P. 123–130.

Глава 3

ПРИНЦИПЫ НАДМОЛЕКУЛЯРНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ БИОЛОГИЧЕСКИХ СТРУКТУР

Продолжим знакомство с биоструктурами. В отличие от предыдущей главы, в которой изложены устоявшиеся сведения из биохимии, в данной главе будет рассмотрено развитие представлений и проведен обзор современного состояния исследований в области надмолекулярной организации биологических структур (в первую очередь, белков и их комплексов). Приведенные идеи и научные результаты будут полезны нам и в последующих главах книги.

3.1. Физико-химические основы формирования надмолекулярных структур

Считается, что надмолекулярная структура белка формируется под влиянием гидрофобных и ван-дер-ваальсовых взаимодействий, а также при участии полярных взаимодействий — «солевых» (ионных) и водородных связей [1, 2]. Их значение в процессах стабилизации и самоорганизации белковых структур неоднократно пересматривалось. В начальный период (50^{e} годы) основными силами, участвующими в этих процессах, считались ионные и водородные связи [3]. К началу 90^{x} годов возобладала точка зрения о доминирующей роли гидрофобных и ван-дер-ваальсовых взаимодействий [4, 5]. Исходя из этих взглядов, делаются попытки осуществлять самоорганизацию полимеров [6]. В настоящее время, однако, складывается более сбалансированный взгляд, признающий важную роль как полярных, так и неполярных взаимодействий [7]. Проявление этих сил, как правило, осуществляется в присутствии воды, естественной среды всех надмолекулярных структур.

3.1.1. Взаимодействие надмолекулярных структур с водой. В соответствии с общепринятым в настоящее время взглядом (можно назвать это парадигмой), вода, являясь естественной средой, в которой находятся надмолекулярные структуры, оказывает сильное воздействие на их организацию и функционирование. Именно поэтому основные результаты по исследованию биополимеров получены на их водных растворах. Отметим, однако, что имеется весьма существенная разница в концентрации этих полимеров *in vivo*, в живых организмах, и *in vitro*, т. е. в условиях экспериментов. В живых клетках концентрация белков составляет 10–20 % и более, тогда как в экспериментах работать с полимерами такой концентрации крайне неудобно — они будут либо очень вязкими (коллоиды), либо будут выпадать в осадок от перенасыщения. Поэтому нужно делать оговорку, что представления о силах, определяющих формирование белков, возникли как результат работы с разбавленными растворами этих структур.

То же можно сказать, например, и о биомембранах, комплексных надмолекулярных структурах, важным компонентом которых являются липиды. Считается, что

наиболее близкой моделью биомембран являются бислои липидов, которые обычно формируют в водных растворах. В то же время, в реальных клетках, как правило, большая часть липидов находится в комплексе с белками и другими компонентами. Поэтому всегда стоит вопрос о правомерности переноса результатов, полученных *in vitro*, на то, что имеется в живых клетках.

Тем не менее, современные исследования уделяют роли воды в биоструктурах большое внимание. Найдено, что вода играет важную функциональную роль в ферментативном катализе [8]. В отсутствии воды белки не могут изменять свою структуру и проявлять каталитическую активность, причем для ее проявления иногда достаточно иметь монослой молекул воды [9]. При переносе белков в другие растворители всякая их подвижность и активность теряется [10], хотя их стабильность в неполярных растворителях, например, циклогексане, выше, чем в воде [11].

Показано участие воды в процессах самоорганизации белков («модель расплавленной глобулы») [12], их свертывании [13] и разворачивании [14]. Вода участвует в обеспечении конформационной стабильности [15], динамики и пластичности белков [16, 17], в белок-белковых взаимодействиях [18, 19], в связывании лигандов [20], а также в обеспечении избирательности и специфичности биоструктур [21].

Исследование взаимодействия белков с водой проводится различными методами, в том числе спектроскопическими (инфракрасной, рамановской, флуоресцентной спектроскопией), однако наиболее информативные результаты получают при использовании методов ядерного магнитного резонанса (ЯМР) и рентгеноструктурного анализа (РСА) [22]. Применение последнего метода выявляет не только наличие, но и структуру воды, локализованной в белках.

Молекулы воды, связанные с белками, могут быть, в основном, двух типов: пространственно встроенные, находящиеся, как правило, внутри белковой структуры и наружные, относительно слабо связанные с белком. Характерным примером является структура фермента эластазы, недавно изученная методом РСА в различных смесях воды с органическими растворителями [23]. Большая часть связанных молекул воды (общее их число составляет 426) меняет в структурах этого белка свое положение в зависимости от типа растворителя, но положение некоторых (около 20 молекул) остается неизменным. Они образуют своеобразные каналы с системами водородных связей воды. Протяженные системы водородных связей, с участием молекул воды и полярных группа белка, найдены и в других структурах [24, 25]. Такие сети достаточно подвижны и обеспечивают регуляцию конформационных изменений отдельных доменов в белках [26]. По всей вероятности, именно через воздействие на эти системы осуществляют свою регуляторную роль катионы и анионы в процессе образования комплексов белков [27]. В разделах 5.2.3 и 7.2.1.3 будет подробно рассмотрена роль структурного встраивания молекул воды с позиции развиваемых в данной книге взглядов.

3.1.2. Гидрофобные взаимодействия. Как мы видели в предыдущей главе, полипептидные цепи белков содержат в своем составе неполярные боковые цепи аминокислот. Значительные неполярные фрагменты содержат в своей структуре и липиды, такие как холестерин, глицериды и сфинголипиды. При взаимодействии с водой эти группировки вызываю перестройку водородных связей воды. Чтобы сохранить количество водородных связей без изменений, молекулы воды располагаются вокруг неполярных соединений. Сами по себе гидрофобные группы не вызывают

больших изменений энальпии, но приводят к увеличению локальной упорядоченности (уменьшению энтропии). Вода имеет тенденцию снова увеличить свою энтропию, вследствие чего остатки аминокислот вытесняются из воды и формируют гидрофобное ядро белковой глобулы. Считают, что именно гидрофобные силы определяют формирование этого ядра.

Впервые концепция «гидрофобности» для объяснения процессов свертывания и разворачивания структуры белка была сформулирована В. Кауцманом в 1959 году [28]. Важный вклад в развитие этой идеи был сделан в работе [4]. Эта концепция оказала существенное влияние на развитие исследований самоорганизации белковых структур и послужила отправной точкой для изучения закономерностей формирования вторичных структур белков [29, 30] и белковых «мотивов» [31], а также их стабилизации [32]. Показано, в частности, что эти взаимодействия стабилизируют как вторичные структуры глобулярных белков, рассматриваемых на основе модели сворачивания «расплавленной глобулы» [33], так и промежуточные переходные состояния, возникающие в процессе свертывания белков [34].

Имеются работы, в которых рассматривается вклад гидрофобности в процессы белок-белковых взаимодействий [35] и белок-белкового распознавания [36]. На основе представлений о гидрофобных взаимодействиях разработаны теоретические модели свертывания белков [37], а также развиваются экспериментальные подходы к получению искусственных белков с заранее заданной структурой [38, 39].

Важную роль, по современным представлениям, гидрофобные взаимодействия играют в биомембранах, которые являются, как было упомянуто выше, комплексными надмолекулярными структурами. Эти представления основаны на том, что поведение чистых липидов, в частности, фосфолипидов, полностью определяется гидрофобными взаимодействиями. Для того, чтобы контакт остатков жирных кислот фосфолипидов с водой был минимальным, необходимо, чтобы эти остатки были ориентированы внутрь бислоя липидов, тогда как их гидрофильные полярные группировки, находясь на поверхности бислоя, будут контактировать с водным окружением. Логика этих рассуждений оказалась настолько убедительной, что легла в основу наиболее популярной во второй половине прошлого века жидкостно-мозаичной модели биомембран [40].

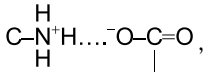
На современном этапе появившиеся данные о характере взаимодействия гидрофобных частей липидов с соответствующими частями белковых структур [41] способствовали усилению интереса к анализу липид-белковых соответствий [42, 43]. Однако, силы, участвующие в формировании таких контактов следует отнести скорее не к гидрофобным, а к ван-дер-ваальсовым, к рассмотрению которых мы переходим.

3.1.3. Силы Ван-дер-Ваальса. В плотно упакованных структурах между неполярными группами —CH…HC– возникают силы притяжения, которые носят название ван-дер-ваальсовых взаимодействий. Их энергия составляет 0,003 ккал/моль, но несмотря на столь малую величину, они играют достаточно важную роль в стабилизации белков и более сложных, комплексных структур. Уже довольно давно установлено [44], что плотность упаковки белкового ядра близка к плотности упаковки молекулярных кристаллов (0,75). При такой плотности упаковки молекулы воды не могут проникнуть внутрь белкового ядра. При этом будут затруднены и молекулярные движения внутри такого ядра. Поэтому такие движения оказываются возможными лишь между отдельными, менее прочно связанными функциональными

доменами. Важно отметить, что плотность упаковки может сохраняться путем согласованных мутаций в структуре белка. На это указывает известный в литературе факт, когда уменьшение размера одной аминокислоты, например, Ile → Val, ведет к соответственному увеличению другой: Gly → Ala [45].

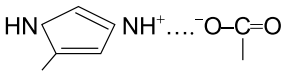
Ван-дер-ваальсовы взаимодействия существенны также при формировании липид-белковых комплексов. В упоминавшейся выше работе [41] было впервые показано, как жирная кислота фосфолипида контактирует со спиральным фрагментом убихинол-цитохром-С-редуктазного комплекса. Аналогичный характер липид-белковые взаимодействия имеют и в других комплексах белок-липид [46]. В целом эти взаимодействия, как и внутри белкового гидрофобного ядра, носят характер плотной упаковки. Более детально они будут рассмотрены в главе, посвященной мембранам.

3.1.4. Полярные взаимодействия. В состав большинства биомолекул и биополимеров, кроме неполярных фрагментов, входят функциональные группы, характеризующиеся различной степенью полярности. Они вступают во взаимодействия с растворителем, а также между собой, образуя «солевые», ионные и водородные связи. Различия между этими типами связей довольно условны. По существу, во всех случаях речь идет о водородных связях, обладающих различной степенью полярности. В частности, связь между аминогруппой лизина и карбоксильной группой глютаминовой или аспарагиновой кислот, часто рассматриваемая как ионная (схема 3.1), т. е.



(3.1)

по существу является ионно-водородной, причем эта аминогруппа может образовать в общей сложности три водородных связи. Аналогичную связь между гистидином и какой-либо карбоксилсодержащей аминокислотой, например (схема 3.2):



(3.2)

также можно считать ионно-водородной.

В структуре белков можно выделить следующие основные типы водородных связей ближнего порядка:

— системы HN–C=O-групп основной цепи, обычно между NH-группой i-го α-углеродного атома и O=C-группой (карбонилом) $i-3$-го или $i-4$-го остатков;

— связи боковых цепей с основной цепью (чаще всего они образуются между полярной группой i-й боковой цепи и $i-4$-м, $i-3$-м карбонилом пептидной связи основной цепи);

— связи боковых цепей (обычно они образуются между i-й–$i-2$-й, i-й–$i-3$-й или i-й–$i-4$-й боковыми цепями).

В работе [47] проведено всеобъемлющее исследование распределения водородных связей в глобулярных белках. Найдено, что большинство водородных связей носит локальный характер, за исключением ионных пар и образуются между атомами основной цепи (примерно 68 %). Как правило, белки имеют протяженные вторичные структуры (82 %). В изученных авторами белках 30 % водородных связей образуются между i-й NH-группой и $i-3$-м карбонилом, почти треть — с $i-4$-м карбонилом и менее одной трети — в b-структурах. Боковые цепи, образующие водородные связи с основной цепью, локализованы в начале спиралей (так называемые кэпы) [48, 49],

причем большая часть систем водородных связей локализовано именно в спиралях. Отметим, однако, что вывод о локализации этих связей в начале спирали носит ограниченный характер (см. гл. 9).

Кроме перечисленных, в белках встречаются водородные связи дальнего порядка, образующиеся между боковыми цепями аминокислот, и пептидными группами, а также между боковыми цепями, сближающимися в пространстве после того, как белок приобретает свою нативную структуру.

В существующих классификациях водородных связей [1, 47] внимание сконцентрировано на атомах, участвующих в их формировании. Однако такой акцент не позволяет охватить все многообразие таких связей. Другой, более формальный подход, будет описан в данной книге.

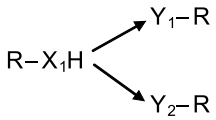
Водородные связи возникают также между отдельными субъединицами белков в процессе формирования олигомерных структур, а также между белками и входящими в их структуру функциональными молекулами (например, кофакторами в структуре многих ферментов — дегидрогеназ [49–52] или молекулами фосфолипидов [53] в составе биомембран). Как правило, анализ таких связей в известной нам литературе ограничен областью контакта лиганда с белком. С позиции излагаемого в данной книге подхода, этот контакт значительно сложнее, что будет показано в разделах, посвященных биокатализу (гл. 10) и структуре биомембран (гл. 11).

Роли полярных взаимодействий в формировании надмолекулярных биоструктур придают в настоящее время не меньшее значение, чем гидрофобным силам [54]. Установлено, что существенный вклад в стабилизацию структуры белков и пептидов фрагментов вносят ионные пары аминокислот и водородные связи [55]. При этом наибольшее влияние на формирование их вторичной структуры оказывают электростатические взаимодействия боковых цепей с основной цепью и между собой [56–60]. В тех же случаях, когда расчеты показывают сильное влияние гидрофобных эффектов, роль солевых мостиков и других полярных взаимодействий сводится к ограничению числа низкоэнергетических конформаций макромолекул и в придании специфичности и уникальности в процессах сворачивания белков или узнавания белками лигандов [61].

3.1.5. Системы водородных и солевых связей. Как мы рассматривали выше, принципиальной разницы между солевыми и водородными связями нет. Поэтому не удивительно, что оба типа связей образуют протяженные системы и их часто рассматривают вместе [62]. Впервые о системах водородных связей как одной из существенных основ построения биоструктур стало возможным говорить после того, как Л. Полинг на основе данных рентгеноструктурного анализа предложил две модели вторичной структуры белков: α-спирали и β-структуры [63, 64]. В настоящее время эти, и еще ряд других, сходных структур считаются установленным фактом. В этих структурах пептидные группы образуют между собой водородные связи и формируют непрерывные системы, часто называемые системами пептидно-водородных связей. Последующие исследования показали, что кроме этих систем, встречаются и другие, с участием боковых цепей аминокислот. Например, они были обнаружены в термолизине [65], каталазе [66], комплексах цитохромов [41, 67] и многих других. Подобные системы участвуют в формировании активных центров ряда ферментов (так называемые «системы передачи заряда») [68], а также стабилизируют структуру комплексов белков с нуклеиновыми кислотами, например, вирусов [69, 70].

Системы водородных и ионных связей, проявляют выраженные кооперативные свойства [71]. Это отражается на термостабильности и других свойствах белков. Имеются многочисленные работы, посвященные анализу таких систем как в отдельных белках [72, 73], так и в группах белков [74, 75].

Следует отметить, что особенностью некоторых водородных связей, входящих в такие системы, является то, что они образуют разветвления (бифуркации) [76]. В литературе такие водородные связи называют вилочковыми. Особенность этих связей состоит в том, что они существуют поочередно то с одной, то с другой группой (схема 3.3):



. (3.3)

Этим связям пока не уделяется должного внимания. В шестой главе нашей книги (раздел 6.2.1) мы рассмотрим возможные функции вилочковых водородных связей с позиции развиваемого нами подхода.

В целом, однако, в литературе отсутствует обобщенный взгляд на роль систем водородных связей в биологических надмолекулярных структурах. Показу их значимости будет посвящена большая часть этой книги.

3.2. Общая организация надмолекулярных структур

Взгляд на биоструктуры как на многоуровневые системы отражает общее представление об иерархическом строении надмолекулярных биоструктур [77]. Однако нужно иметь в виду, что это не простая иерархия, где каждый элемент нижележащего уровня подчинен элементу вышележащего уровня. На каждом уровне мы наблюдаем периодичность, повторяемость элементов, что является признаком параллельности идущих на этом уровне процессов. В этом плане показательны органы, состоящие из повторяющихся идентичных клеток органа (тканей). Ближе к предмету нашей книги находятся клетки, содержащие различные типы структур, например, мембраны, микротрубочки, сократительные фибриллы (жгутики) и т. д. Все эти структуры, как правило, состоят из повторяющихся в пределах структуры элементов. Повторяемость элементов на каждом уровне накладывает отпечаток и на характер управления состоянием того или иного уровня. Если на вышележащем уровне производится некий управляющий сигнал, например, выработка растворенного в воде медиатора, то через систему рецепторов нижележащего уровня этот сигнал воздействует на всю периодическую структуру одновременно, которая будет реагировать на него как единое целое. Отметим, что количество рецепторов на нижележащем уровне существенно меньше общего числа элементов. По этой причине при минимальном воздействии на нижележащем уровне достигается максимальный эффект. Очень часто в процессах управления состоянием биоструктур мы имеем дело с принципом каскадного усиления сигналов. Следствием идентичности элементов, входящих в структуры на каждом уровне организации, является упорядоченность их расположения. В данном разделе мы рассмотрим самый верхний уровень организации надмолекулярных биоструктур. Всем другим нижележащим уровням также будут посвящены свои разделы.

3.2.1. Уровни организации биоструктур. Классическое подразделение уровней организации надмолекулярных биоструктур включает следующие четыре уровня:

— первичная структура — последовательность звеньев в цепном полимере (аминокислот в белках, нуклеотидов — в нуклеиновых кислотах, углеводных остатков — в линейных фрагментах полисахаридов);

— вторичная структура — упорядоченное расположение основной цепи цепного полимера в пределах небольшого числа звеньев, например: i–$(i-2)$, i–$(i-3)$, i–$(i-4)$. Для белков такими структурами являются β-складчатые структуры (звенья i–$(i-2)$–$(i-4)$ лежат в одной плоскости), спирали 3_{10} (i-й остаток совпадает по положению с $i-3$-м), и α-спирали (период идентичности в них составляет 36 остатков). Менее четко выражены элементы вторичной структуры в нуклеиновых кислотах;

— третичная структура — способ укладки вторичных структур, трехмерная их организация, обладающая достаточно большим разнообразием; как правило, речь идет об отдельных субъединицах белков или белковых комплексов;

— четвертичная структура — тип ассоциации отдельных субъединиц в намолекулярное образование.

Следует отметить, что хотя в литературе в качестве надмолекулярной структуры обычно рассматриваются именно четвертичные структуры, однако этот термин, ввиду отсутствия иных терминов, удобно использовать и при анализе других уровней выше первичного. Отчасти это оправдано тем, что формирование уровней, начиная со вторичной структуры, определяется теми же силами: гидрофобными и ван-дерваальсовыми взаимодействиями, а также водородными и ион-дипольными связями.

Кроме классического подразделения, при анализе третичных структур часто используются представления о доменах. Доменами называют определенным образом организованные фрагменты белков, увязанные с выполнением каких-либо функций. Примером доменов являются участки, связывающие нуклеотиды, кофакторы ферментов-дегидрогеназ [78, 79]. Именно внутри таких доменов часто обнаруживаются разветвленные системы водородных связей. Отметим, что домены не изолированы от остальной структуры белка и являются частью интегрального целого.

Из всех особенностей, которые могут быть рассмотрены в надмолекулярных структурах, наибольшее внимание мы уделим вопросам симметрии и периодичной организации. Как правило, они связаны и с функциональными свойствами этих структур.

3.2.2. Симметрия. Элементы симметрии наблюдаются практически на всех уровнях организации надмолекулярных структур, начиная со вторичной структуры, однако для большинства структур и комплексов она присуща в первую очередь четвертичным структурам, что связано с тем, что они строятся, как правило, из идентичных субъединиц или идентичных комплексов [1].

Согласно [82], эволюционный отбор олигомерных комплексов обусловлен функциональными, генетическими и физико-химическими причинами. Большие белки отобраны природой как для выполнения морфологических функций, таких как образование колец, контейнеров и филаментов, так и для реализации кооперативных функций, таких как аллостерическая регуляция и поливалентное связывание. Олигомерные белки являются также более стабильными по отношению к факторам денатурации, обладают меньшим размером контакта со средой по сравнению с индивиду-

альными мелкими белками. Как считается в работе [82], симметричные олигомеры обеспечивают контроль ошибок в процессе биосинтеза, эффективное кодирование и регуляцию самосборки. Другие причины, обуславливающие существование олигомерных белков, даны в разделах 5.2.4 и 5.2.5 этой книги.

3.2.2.1. ***Терминология.*** В работе Моно и др. [80] было предложено называть субъединицы белков протомерами. Возможно два способа укладки протомеров: идентичными участками друг к другу — изологический тип укладки (пример — цифры $6 \cdot 9$) и различными областями — гетерологический тип. Наиболее распространен изологический тип уладки, который приводит к формированию замкнутых структур, так называемых «замкнутых кристаллов», а также их укладке в виде двумерных структур («двумерных кристаллов»).

К надмолекулярным структурам часто применяется симметрия точечных групп, обычно используемая в кристаллографии [81]. Существует два типа обозначений этих групп — терминология Шёнфлиса, часто применяемая химиками и кристаллографические обозначения. По Шёнфлису выделяют 5 типов точечных групп, приведенных ниже, которые применяют при описании расположения протомеров. В скобках приведены их кристаллографические обозначения.

1. Циклические точечные группы C_n, (где n — 2, 3, 4 и т. д.) с одной осью симметрии n-го порядка (кристаллографические обозначения 2, 3, 4, ...).

2. Диэдральные группы $D_{n/2}$, т. е. D_2, D_3, D_4, где n — 4, 6, 8 и т. д., с одной осью $n/2$ и второй $n/2$ двойной осью симметрии (группы 22, 32, 42).

3. Тетраэдрические группы — T (группы 23) включают 12 протомеров 4 тройных и 3 двойных оси.

4. Октаэдрические группы — O (432), содержат 24 протомера, 3 четверных, 4 тройных и 6 двойных осей.

5. Икосаэдрические группы — I (532) — состоят из 60 протомеров, 6 пятерных, 10 тройных и 15 двойных осей.

Ограниченное число типов точечных групп, встречающихся в структурах биологического происхождения, связано с хиральностью элементов (аминокислот и нуклеотидов), входящих в состав цепных полимеров. Она обуславливает лишь один тип направления спиралей, в которые они сворачиваются при формировании надмолекулярных структур, что исключает центры инверсии и отражения [1]. В работах [82, 83] приведены характерные примеры белковых структур, обладающих различными типами симметрии. Следует отметить, что характер выполняемых биоструктурами функций в той или иной степени отражается на их симметрии.

3.2.2.2. ***Циклические точечные группы (C_n).*** Наиболее распространенной циклической группой в надмолекулярных биоструктурах является вращательная симметрия второго порядка (C_2, 2-fold symmetry). Начнем с того, что цепи двойной спирали ДНК антипараллельны, вследствие чего сахаро-фосфатный остов имеет симметрию C_2 [84] (модель — pdb-файл 285D). Возникающие в пределах двойной спирали поворотно симметричные последовательности нуклеотидов (так называемые палиндромы) являются также примером C_2 симметрии [85].

Симметрия второго порядка, присущая нуклеиновым кислотам, накладывает определенные ограничения на характер взаимодействующих с ними белков [86]. Такие белки, выполняющие регуляторную функцию, как Кро, лямбда-репрессор (1lmb), TRP-репрессор (1tro), БАК (белок, активирующий катаболизм), связанные двумя

симметричными участками ДНК, являются димерами или тетрамерами и имеют симметрию второго порядка. Образование комплексов осуществляется главным образом за счет водородных связей между ДНК и белками. Многие ферменты, обладающие специфическим узнаванием ДНК и способностью ее разрезать (рестриктазы) состоят из двух субъединиц и имеют симметрию C_2 (файл 1rva) [87]. Более того, структура гистонов, образующих основу ДНК-белковых комплексов (нуклеосом) ядерного вещества клеток (хроматина), состоит из четырех взаимосвязанных белков и обладает осью симметрии второго порядка (1m19-A) [88].

Многие ферменты построены из двух субъединиц [1]. В частности, ими являются алкогольдегилдрогеназа (1hld) [78], дигидрооротатдегидрогеназа (2dor) [89], каталаза (8cat) [90], глютатионтрансфераза (1gst) [91], триозофосфатизомераза (7tim) [92], тирозил-т-РНК-синтетаза (4ts1) [93], принадлежащие к разным классам ферментов. Как правило, их взаимная укладка относится к изологическому типу.

Широко известную структуру гемоглобинов, состоящую из двух отличающихся друг от друга субъединиц, обычно относят к симметрии D_2[94], однако, по сути, этот комплекс обладает симметрией C_2(1hhb). Более того, этой симметрией обладают комплексы, состоящие из большого числа разных по свойствам белков, такие как убихинол-цитохром-С-редуктаза (11 белков — 1ntm) [95], цитохромоксидаза (11 белков — 1v54) [96], комплекс АТФ и петруссис-токсина (6 белков — 1bcp) [97], синтетаза жирных кислот (1ek4) [98] и ряд других. Многие из них находятся в биомембранах [95, 96] и образуют двумерные структуры.

Значительно реже встречаются в белках точечные группы C_3, к которой принадлежат белки бактериородопсин (1brr) [99], порин [100], альдолаза [101], C_4 — нейраминидаза [102], C_5 — пентраксины (1gnh) [103] и токсины холеры (1fgb) [104], содержащих соответственное число субъединиц.

К числу белков с циклическими точечными группами относятся также исследованные сравнительно недавно структуры сывороточного амилоид Р компонента, бактериального шаперонина GroEL, 20S протеасомы, светособирающих комплексов и белка триптофанового оперона, проанализированные в обзоре [105]. Во многих случаях циклическая организация связана с особенностями биофизических свойств и биологических функций этих белков. К числу редких относится точечная группа C_{17}, найденная в диске вируса табачной мозаики [106].

3.2.2.3. ***Диэдральные точечные группы $D_{n/2}$.*** Белки, принадлежащие к точечной группе D_2, расположены в виде тетраэдра. В этом случае любая из субъединиц может содержать по крайней мере три типа контактов — по одному на пересечении с каждой осью второго порядка. Примерами белков, принадлежащих к этой группе относятся конканавалин А — белок из микроорганизмов (5cna)[107], белок яйца — овальбумин (1ova) [108], а также ферменты — глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (1ihx) [109], лактатдегидрогеназа (1j4a) [110], пируваткиназа (1pkn)[111], фосфоглицератмутаза[112].

Более сложные белки, относящиеся у точечной группе $D_{n/2}$, встречаются сравнительно редко. В качестве примера можно привести белок гемэритрин [113], содержащий порфириновую группировку с атомом железа в центре.

3.2.2.4. ***Комплексы белков, описываемые точечными группами высшего порядка.*** К таким комплексам можно отнести, олигомеры, описываемые D_3, октаэдрической и икосаэдрической группами симметрии. Обычно к этим группам относятся

мультферментные комплексы. Так, симметрию D_3-32 имеют белки аспартат-траскарбамоилаза [114] и фазеолин [115], октаэдрическую — апоферритин [116].

Одной из самых сложных является точечная группа икосаэдра. Наиболее часто это группа описывает геометрию оболочек вирусов и фагов [117, 118], хотя она не исключена для надмолекулярных структур животных и растений.

3.2.3. Периодичность надмолекулярных структур. Наличие симметрии в надмолекулярных структурах обуславливает и возможность появления у них периодической организации. Из возможных вариантов мы рассмотрим спиральную и двумерную организацию. Такую организацию могут иметь в процессе кристаллизации многие белки, выделяемые из клеток, однако мы уделим наибольшее внимание реально встречающимся в клетках структурам. На примере периодичных структур мы наблюдаем появление видимой прямой связи между организацией структуры и ее функциональными свойствами.

3.2.3.1. ***Спиральные структуры.*** Структура капсида ряда бактериофагов, таких как PH75, Pf1 и Pf3 обладает спиральной симметрией [119]. При этом, например в 7000 идентичных субъединиц фага Pf1, каждая из которых содержит 46 аминокислот, уложены таким образом, что имеют тот же шаг спирали, как и находящаяся внутри капсида ДНК–16А [120, 121]. Такая укладка обеспечивает возможность сохранения структуры ДНК и, вероятно, ее проникновению внутрь чужеродной клетки. Спиральная симметрия также характерна для укладки белков шейки икосаэдрических вирусов, внутри которой образуется канал, по которому проходит инфицирующая ДНК [122].

Сочетание актина, миозина и целого ряда других вспомогательных белков обеспечивает процесс обратимого мышечного сокращения. В этом ансамбле выявляется спиральная симметрия [123], хотя структура ансамбля пока далека от своего полного выяснения [124].

Жгутики — органоиды клеток, обеспечивающие их подвижность, являются наименьшими из известных пропеллеров. Устройство жгутиков эукариот и прокариот несколько отличается. У последних они состоят: из базального тельца, часть которого является мотором, приводимым в движение протонами, крюка, универсального передатчика вращательного движения и филамента — белкового ансамбля, превращающего вращательное движение в линейный толчковый удар [125]. Филамент имеет трубчатую структуру и спиральную симметрию, которая формируется на основе 11 протофиламентов. Каждый протофиламент в спирализованном состоянии может находиться в одной из двух конформаций — L- или R-типа. Недавно, с использованием метода электронной криомикроскопии, структура филамента бактерий изучена с разрешением 4 А [126]. Очевидно, что именно такой сверхспирализованный ансамбль, состоящий из димерных молекул белка флагеллина, необходим для выполнения жгутиком функции клеточной подвижности. Жгутики эукариот, которыми обладают реснички свободных микроорганизмов, эпителиальных клеток, сперматозоидов и т. д., отличаются тем, что содержат по периметру девять парных микротрубочек и две отдельных трубочки в центре. Расположение α- и β-субъединиц белка тубулина, из которого состоят микротрубочки, также имеет спиральную симметрию [127].

Микротрубочки цитоскелета — другой вариант микротрубочек, состоящих из повторяющегося гетеродимера (α- и β-субъединиц тубулина), образуя 13 или 14 про-

тофиламентов. Они могут быть организованы в два типа решеток (A или B) и имеют спиральную симметрию [128]. В нервных клетках находят преимущественно B-тип решетки, в то время как A-тип онаруживается в местах стыковок (швах) микротрубочек. По микротрубочкам осуществляется активный энергозависимый транспорт различных веществ. В последние годы к микротрубочкам проявляется интерес как к возможным устройствам биомолекулярной наноэлектроники [129].

3.2.3.2. ***Двумерные структуры.*** Наличие симметрии в укладке субъединиц создает условия и для формирования периодических двумерных структур. Для этого необходимо, чтобы ось симметрии олигомерной структуры была перпендикулярна плоскости, в пределах которой возникает периодическая структура. Обычно олигомерные структуры, формирующие двумерные структуры, относятся к циклическим группам симметрии (C_2, C_3, C_6). Наиболее наглядно это проявляется в структуре биомембран (подробно см. гл. 11). В этом же разделе мы кратко рассмотрим современные работы, посвященные этим и некоторым другим двумерным структурам.

Сначала отметим, что кроме природных клеточных стенок и биомембран двумерные структуры обнаружены для некоторых ферментов, например, каталазы [130], являющейся димером (группа симметрии C_2), а также комплексов F-актина с гликолитическими ферментами альдолазой и глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназой и некоторыми другими белками [131].

Типичным примером двумерных структур являются S-слои — регулярным образом расположенные белки и гликопротеины, формирующие двумерные кристаллические структуры и являющиеся наружной частью клеточных стенок бактерий [132, 133]. Выделенные в чистом виде, они снова рекристаллизуются и образуют двумерные решетки. Можно считать, что существование в виде двумерных слоев является их природным свойством. Регулярная структура, а также высокая стабильность этих белков в условиях повышенных температур и низких значений pH делает их перспективными для применения в биомолекулярных нанотехнологиях [133].

Наиболее часто применяемым методом для изучения двумерных структур, в частности, мембран, является метод электронной криомикроскопии, состоящий в том, что образцы нативных мембран в процессе электронной микроскопии находятся при температуре -170 °C, чтобы предотвратить их дегидратацию в вакууме, а также радиационное повреждение. При этом проводится послойная съемка двумерных объектов, с последующим Фурье-синтезом, что позволяет осуществлять трехмерную реконструкцию белков с достаточно высоким разрешением (от 10–12 Åдо 3,5 Å). Впервые этот метод был разработан в работах [134, 135] для изучения структуры бактериородопсина (тримера, имеющего симметрию C_3) в нативных мембранах пурпурных бактерий Halobacterium halobium. Разрешение структуры бактериородопсина, полученное этим методом, достигло 3,5 Å[136]. Детали этой структуры, полученные с учетом других методов, будут рассмотрены в разделе 6.2.1.1.

В настоящее время исследование структуры нативных мембран сочетается с реконструкцией двумерных кристаллов с помощью липидов, как выделенных из тех же источников, так и другого типа. Таким методом исследованы структуры сенсорного родопсина II из археобактерий с разрешением 6,9 Å[137], родопсинов беспозвоночных [138] и позвоночных [139, 140] животных, целого ряда транспортных белков [141–144], АТФ-аз [145, 146], мембранных рецепторов [147, 148], белков, формирующих водные поры (аквапоринов) [149, 150] и другие каналы [151]. Более

того, метод оказался пригоден и для исследования целых комплексов белков таких как фотосистемы II растений [152]. (Однако в скобках отметим, что в отличие от фотосистемы II структура комплекса цитохромов bc_1 животных кристаллизовалась в виде трубчатых структур [153]). Подробный анализ этого метода и полученных результатов приведен в ряде обзоров [154, 155]. В целом, заканчивая рассмотрение двумерных кристаллов биомембран и выделенных из них белков, складывается общее впечатление об упорядоченной, квази-кристаллической организации этих надмолекуляных структур. Мы используем этот вывод при обсуждении современных моделей биомембран (гл. 11).

3.2.4. Область контакта субъединиц. Необходимость рассмотрения области контактов субъединиц обусловлена тем, что в ней находятся те фрагменты структуры субъединиц, которые определяют их взаимное расположение. Проводя идею о том, что расположение аминокислот в первичной структуре белков определяется вышестоящими уровнями организации, область контакта как раз и может служить наглядным проявлением этой идеи. В самом деле: устойчивый контакт между субъединицами может возникнуть лишь в том случае, если в определенном месте каждой из субъединиц находятся именно те группы, которые этот контакт обеспечивают. Это значит, что в процессе эволюции эти области должны быть либо консервативными, либо согласованно изменяться, обеспечивая устойчивый контакт субъединиц. Важность области контакта субъединиц определяется также тем, что через нее могут проходить линии связи и каналы переноса зарядов [156, 157], обеспечивающие взаимодействие между функциональными центрами субъединиц, а также «выделенные степени свободы», необходимые для конформационной релаксации надмолекулярной структуры [158]. Чтобы более определенно обсуждать эти вопросы, изложим кратко современные сведения об области контакта субъединиц.

3.2.4.1. ***Плотность упаковки.*** Интерес к области контакта субъединиц обнаружился уже давно. Поэтому естественным было выяснение вопроса о плотности упаковки в области контакта субъединиц. Как оказалось, плотность упаковки области контакта белковых субъединиц столь же велика, как и остальной части белка [159, 160]. Это означает, что при образовании надмолекулярных комплексов из субъединиц используются, скорее всего, те же принципы, что и при формировании самих субъединиц.

3.2.4.2. ***Особенности контактов в зависимости от типа ассоциации белков.*** Область контакта белков зависит от типа их ассоциации. Следует различать несколько типов ассоциации белков. Первый тип — это комплексы, состоящие из нескольких структурно и функционально различающихся белков. К ним относятся, например, упоминавшиеся выше комплексы убихинол-цитохром с редуктазы (11 различных белков) [67] и гистонового ядра (4 типа гистонов) [88]. В обоих случаях эти комплексы представлены в виде функциональных димеров, в которых часть белков, входящих в комплексы, не имеет стабильной надмолекулярной структуры. По сути, мономеры этих комплексов можно рассматривать их как субъединицы, состоящие из нескольких полипептидных цепей. В этом случае говорить о каких-либо особенностях контакта отдельных белков комплекса не приходится — они являются частью интегрального целого.

Второй тип — это ассоциация близких по свойствам (или идентичных) субъединиц. В качеств примеров могут служить контакт α- и β-субъединиц гемоглобина [94],

двух субъединиц алкогольдегидрогеназы (3bto) [78] и конканавалина A (1qdc) [107]. В случае гемоглобина наблюдается непрерывная система водородных связей, соединяющая гемы α- и β-субъединиц, а в случае алкогольдегидрогеназы и конканавалина A бета-структура непрерывно переходит из одной субъдиницы в другую. По сути, мы имеем дело с единой структурой, распределенной в обоих субъединицах, являющихся единым целым. Ее особенностью является C_2 симметрия (или квази-симметрия) области контакта. Отметим, что наличие непрерывной β-структуры характерно для многих дегидрогеназ [161], структура которых будет рассмотрена в восьмой главе, а также в других олигомерных ферментах [162, 163].

Наконец, третий тип ассоциации — это ассоциация димеров в более сложные агрегаты (например, димеры димеров). Алкогольдегидрогеназа [78] и конканавалин A [107], упомянутые выше, могут служить также примером такой ассоциации. В области этих контактов степень связи оказывается существенно ниже, а при диссоциации именно этот тип комплексов распадается в первую очередь.

3.2.4.3. ***Группы, расположенные в области контакта субъединиц.*** Анализу групп, расположенных в области контакта субъединиц посвящено сравнительно небольшое число работ [164–166]. Так, в работе [164] рассмотрен вопрос о роли гидрофобных областей в области контакта субъединиц по сравнению с поверхностными областями и найдено их преимущественная локализация в области контакта субъединиц. По данным других авторов [165], которые анализировали выборку из 136 гомодимерных белков из Protein Data Bank, степень гидрофобности поверхности контактов варьирует в широких пределах. Примерно одна треть имеет ярко выраженоя гидрофобное ядро. Оставшиеся две трети содержат в этой области гидрофобные и полярные контакты, а также включают одиночные молекулы воды. На важность полярных взаимодействий в этой области указывается в работе [166]. Таким образом, роль различных типов взаимодействий в области контактов субъединиц зависит от типа белка.

3.2.4.4. ***Роль симметрии поверхностей в области контакта субъединиц.*** Наличие симметрии C_2, широко распространенной в области контакта димеров, позволяет рассматривать комплементарность (лучше использовать более точный термин — «антисимметрия») поверхности двух разных субъединиц и самокоплементарность («антисимметрию») поверхности субъединиц относительно центра антисимметрии. В самом деле (схема 3.4):

$$\begin{array}{ll} \mathrm{A\,B\,C\,D\,E\quad F\,G\,H\,I\,J} & \text{субъединица A} \\ \mathrm{J\,I\,H\,G\,F\quad E\,D\,C\,B\,A} & \text{субъединица B}. \end{array} \qquad (3.4)$$

Если идентичные субъединицы A и B контактируют между собой, образуя димер, то они имеют симметрию C_2. Группы A B C D E субъединицы A антисимметричны группам J I H G F субъединицы B. В силу поворотной симметрии аналогичная антисимметрия будет для групп E D C B A субъединицы B и F G H I J субъединицы A. Значит, группы A B C D E субъединицы A антисимметричны группам F G H I J этой же субъединицы. Вопрос об антисимметрии (самокомплементарности) поверхностей контактов субъединиц был впервые поставлен в известной работе [167], а в дальнейшем более детально рассмотрен в [168]. Последние авторы отмечают исключительную важность поверхностной симметрии области контактов, поскольку ее нарушение ведет к невозможности димеризации, например, α и β цепей гемоглобина. К сожале-

нию, дальнейших исследований в этом направлении нами в литературе не найдено. На наш взгляд, однако, такой анализ очень важен. Если в схеме 3.4 аминокислоты A B C D E расположены последовательно в полипептидной цепи, то в этой цепи должна присутствовать и антисимметричная последовательность F G H I J. A если таких контактных областей несколько, то цепь белка будет обладать несколькими блоками аминокислот, связанными элементами антисимметрии. Последовательный анализ антисимметрии аминокислот в белках, как димерах, так и олигомерах с более сложной организацией, на наш взгляд, сулит заманчивые перспективы и пока еще ждет своего исследователя. В целом роль симметрии в области контакта субъединиц так же важна, как и надмолекулярной структуры в целом.

3.3. Третичная структура белков

Хотя большинство надмолекулярных структур (например, ферментов) работают как олигомеры (димеры, тримеры и т. д.), в качестве элементарных структур можно считать субъединицы. И если ассоциация субъединиц в олигомерные структуры — вещь в целом более-менее понятная, то вопрос об однозначной самоорганизации цепи из аминокислот с определенной первичной структурой в определенную третичную структуру является в настоящее время предметом наибольших дискуссий и исследований. В этом разделе этой проблеме будет уделено достаточно большое внимание.

3.3.1. Подходы к классификации третичных структур. Как мы видели в разделе 3.1.2.2, число типов олигомерных структур не так уж велико и поэтому они сравнительно легко классифицируются. Третичные структуры также доступны для классификации, однако ситуация здесь гораздо сложнее. Количество типов укладки третичных структур, по-видимому, может достигать порядка тысячи [169]. Это, конечно, не бесконечно много (как можно было бы ожидать), но все же достаточно, чтобы создать определенные трудности для нахождения в них порядка.

Построение классификаций третичных структур имеет два аспекта: теоретический и практический. Последний особенно актуален, поскольку количество расшифрованных на основе нуклеотидных цепей первичных структур белков непрерывно растет и существует необходимость в их идентификации. На основе той или иной классификации строятся соответствующие компьютерные базы данных. При их построении часто используют как филогенетический подход, основанный на эволюционном древе развития того или иного белка, так и фенетический, который содержит дескрипторы высшего уровня структур — класс, архитектура, тип складывания. Хотя фенетический подход не является абсолютным, его использование, тем не менее, полезно. Сочетание обоих подходов дает наибольшие результаты. Важным элементом при построении классификаций является также учет доменной структуры белков [170], поскольку именно на уровне доменов проявляется тот или иной тип топологии белковой структуры. Примерами построенных систем идентификации белков (баз данных) являются «CATH» (аббревиатура слов class (C), architecture (A), topology (T) и superfamily (H)) [171], «SCOP» (Structural Classifcation Of Protein) [172] и Dali/FSSP (Fold Structure-Structure Proteins) [173], которые детально сопоставлены в работе [174]. Мы рассмотрим особенности третичных структур, основываясь на базе данных CATH (в русской транскирипции — КАТС).

3.3.2. Примеры укладок доменов третичных структур. Прежде чем переходить к рассмотрению классификации доменов третичных структур на основе работы [171] необходимо рассмотреть хотя бы некоторые из их способов укладки (folds). Приведенные структуры получены с помощью нашей программы Protein 3D, которая изображает фрагменты α-спирали как тетераэдры, а β-структуры — как полосы. При обсуждении примеров в скобках приводятся ссылки на названия файлов PDB-банка.

Глобины и глобино-подобные белки. Эта группа структур содержит, как правило, молекулу гема в качестве простетической группы. Для глобинов характерна определенная топологическая конфигурация, которая состоит почти целиком из α-спиралей. Как правило, белки, образующие вокруг гема один домен, содержат 135–150 аминокислот. На рис. 3.1, *а* приведена структура гемоглобина аскариды (1ash). Близкие структуры имеют гемоглобины морского червя (1hbg), комара (1eca), моллюсков (1flp, 1mba, 3sdh), миноги (2lhb), высших позвоночных — оленя (1hds), человека (4hhb), а также миоглобины кашалота (2mbn), лошади (1dmr), свиньи (1mwc).

Белки с укладкой Up-Down (*вверх-вниз*). Также представляют собой белки, содержащие преимущественно α-спирали. Как правило, такие белки входят в структуру биомембран и их спиральные фрагменты, попеременно меняющие направление (отсюда — вверх-вниз), направлены перпендикулярно плоскости мембран. На рис. 3.1, *б* показана структура бактериального цитохрома C ′ (1bbh), на которой группировка гема (не показана) зажата между двумя шпильками, образованными α-спиралями. Характерным белком этой группы является бактериородопсин (1fbb), содержащий шесть α-спиральных столбов. Более детально он будет рассмотрен в разделе 7.2.1.1.

Двуслойная β-структура. Белки этого типа содержат преобладание β-структурной укладки цепей. Структуры уложены не в один, а в два β-слоя, практически независимых друг от друга. На рис. 3.1, *в* показана структура конканавалина A (2cna) из бактерий, представителя этой укладки в белках.

Трилистник. Эта укладка, также присущая белкам с β-структурой, показана на рис. 3.1, *г*. Видно, что β-структурные участки расположены в форме трилистника. Она найдена в интерлейкине-1 человека (1I1b), в растительном белке бобов (1wba) и некоторых других.

Греческий ключ. Укладка белков в форме «греческого ключа» была впервые обнаружена среди укладок β-структур в работе [175] и состоит в формировании топологии, напоминающей меандр. Эта укладка возможна также и для α-спиральных белков. На рис. 3.1, *д* показана структура растительного аллергена тимофеевки (1who). Из рисунка видно, что «шпильки», образованные антипараллельными β-структурными участками белковой цепи, подобно мотиву рисунка «греческого ключа» укладываются друг в друга с противоположных сторон. Аналогичную структуру имеют также один из доменов бактериальной хитиназы (1ctn), фрагмент фибронектина человека (1fna), кадерин — белок адгезии клеток (1nci) и другие. Подобной укладкой, но состоящей из α-спиралей, обладает колицин A — белок, формирующий поры в бактериах (1col).

α–β-*сэндвич*. Пример такой укладки, найденный в домене одного из рибосомных белков (1ctf) показан на рис. 3.1, *е*. На рисунке видно, что фрагмент α-спирали как бы накладывается на участок с β-структурой. Этот пример открывает серию укладок, в которых присутствуют α-спиральные и β-структурные варианты вторичных структур, в отличие приведенных до этого укладок с преобладанием лишь одного типа вторичных структур.

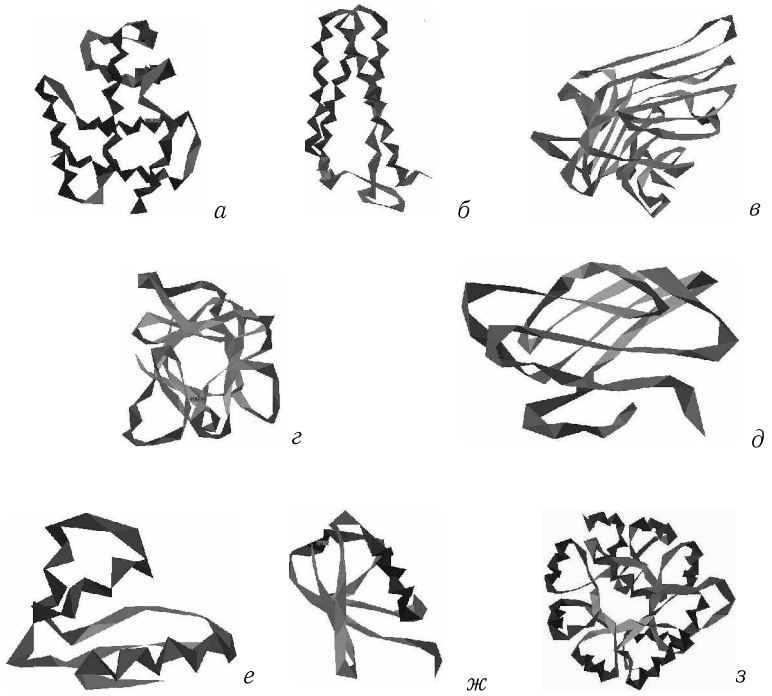


Рис. 3.1. Примеры укладок доменов третичных структур белков: *а* — глобины (1ash); *б* — вверх-вниз (1bbh); *в* — двуслойная β-структура (2cna); *г* — трилистник (1I1b); *д* — «греческий ключ» (1who); *е* — α–β-сэндвич (1ctf); *ж* — α–β-рулон (1ubi); *з* — ТИМ вал (1igs)

α–β *рулон* (α–β *roll*). На рис. 3.1, *ж* показана укладка, называемая АВ рулоном, которая обнаружена в структуре убихитина (1ubi). Одиночная спираль как бы заворачивается β-структурным фрагментом в рулон. Сходную структуру имеет иммуноглобулин-связывающий домен белка G (1igd), а также один из доменов энтеротоксина стрептококков (1esf).

ТИМ вал (*TIM barrel*). Особенность этой укладки состоит в том, что β-структура образует в центре белкового домена своеобразное кольцо, вокруг которого расположены α-спиральные фрагменты. В целом структура приобретает вид вала с шестернями (рис. 3.1, *з*). Она была найдена в структуре индол-3-глицерофосфат синтазы гипертермофильных микроорганизмов (1igs), β-амилазы соевых бобов (1bib), в одном из доменов бифункционального фермента E. coli (1pii) и многих других.

Количество примеров укладок можно увеличить, однако уже на основе приведенных структур можно представить, сколь разнообразен мир третичных структур белков и сколь сложна задача их классификации.

3.3.3. Классификация третичных структур в базе данных CATC. Данная классификация основана на выделении доменов в белках, структура которых определена методом РСА.

Домены. Первоначально структура белка оценивается по числу доменов в структуре и относится к соответствующей категории — с одним доменом или с несколькими доменами. Оценка производится частично автоматически, частично вручную.

Последующие уровни иерархии в данной классификации построены для отдельных доменов.

Классы, *C-уровень*. Все третичные структуры доменов белков, в соответствии содержанием определенного типа вторичных структур, подразделяются в рамках классификации КАТС на четыре класса [171]: класс 1 — содержит белки с преобладанием α-спиральной структуры (они составляют примерно 20 % всех семейств); класс 2 — преимущественно с β-структурой (25 %); класс 3 — со смешанной αβ-структурой(около 50 %); класс 4 — содержит мало вторичных структур. Последний класс является самым малочисленным.

Архитектуры, *A-уровень*. Архитектуры описывают общий вид доменной структуры, как он предопределяется ориентацией вторичной структуры, но не учитывают связь между вторичными структурами. Обычно их определяют вручную, с использованием описания укладки вторичных структур, например, типа вала (barrel), трехслойного сэндвича, бета-пропеллера (b-propellor) или связки из четырех спиралей (alpha four helix bundle). Всего в базе данных выделено 32 различных архитектуры [171].

Топологии (*семейства укладок*), *T-уровень*. Структуры сгруппированы в семейства укладок в зависимости от общей формы и связи между вторичными структурами. Выделение этих укладок производится с помощью специального алгоритма.

Гомологичные суперсемейства, *H-уровень*. Этот уровень группирует белковые домены, которые, как предполагают, имеют общего предка и поэтому описываются как гомологи. Сходство устанавливают сначала на основе сравнения аминокислотных последовательностей, а затем сравнением структур. Структуры попадают в общее семейство гомологов на основе ряда критериев, описанных в базе данных. На рис. 3.2 показаны этапы определения типа структуры с помощью базы данных КАТС.

Мы привели пример построения одной из баз данных, используемых в настоящее время для идентификации третичных структур белков, с тем, чтобы показать, на каких соображениях она базируются.

На наш взгляд, эта база данных, как, впрочем, и другие, не являются окончательным решением проблемы классификации белковых структур, поскольку в них отсутствуют единые принципы их формирования. Попытки построения универсальных классификаций активно предпринимаются [176, 177], что указывает на актуальность данной проблемы.

3.4. Вторичная структура белков

Выше, при анализе третичных структур, мы неоднократно пользовались понятиями α-спирали и β-структуры, рассматривая их в качестве фундамента третичных структур. Со времен уже упоминавшихся выше работ Л. Полинга, описавшего два основных типа структур для белков — α-спираль [63] и β-структуру [64], принципиальных изменений в области вторичных структур белков не произошло. Подробное их рассмотрение будет проведено в шестой главе. Здесь мы акцентируем внимание лишь на то, что в обоих типах структур принципиальное значение имеет наличие в звеньях белка пептидных связей (HN–C=O-групп). В спиральных структурах эти группы, образуют водородные связи с C=O-группой i – 4-го аминокислотного остатка (в α-спирали) или i – 3-го остатка (в спирали 3_{10}). В результате образуются протяженные системы типа HN–C=O…HN–C=O…HN–C=O…HN–C=O, проходящие

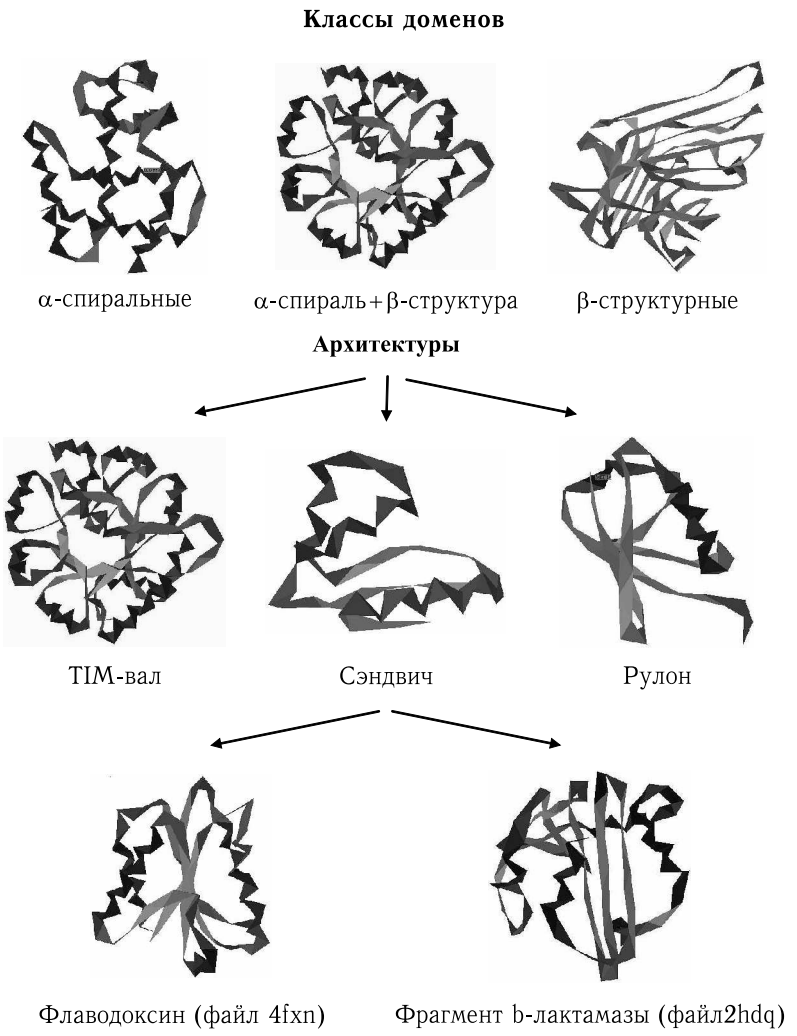


Рис. 3.2. Пример идентификации белков с помощью базы данных КАТС

вдоль спиралей. Для α-спирали таких систем три, для спирали 3_{10} — две. В случае β-структур, в которых полипептидные цепи могут иметь одинаковое направление (параллельный β-слой) и противоположное направление (антипараллельный β-слой), системы HN–C=O-групп расположены поперек слоев.

Следует также обратить внимание на то, что если укладка спиральных структур рассматривается уже как элемент третичной структуры, укладка β-структур является элементом вторичной структуры, которая имеет свою топологию. Мы уже упоминали о том, что впервые топологию β-слоев проанализировала Д. Ричардсон [175]. Успех этой работы связан с тем, что ей удалось предложить наглядный способ описания β-структур, позволивший проанализировать многочисленные варианты их топологии. Пример такого анализа воспроизведен в монографии [178].

Помимо определенных конформаций и входящих в структуру систем HN–C=O-групп, элементами вторичной структуры является также боковые цепи аминокислот. Большая их часть способна к образованию водородных связей и образует их не только с растворителем (водой), но и с основной цепью. Как правило, полярные группы боковых цепей образуют водородные связи с O=C–NH-группами основной цепи (например, с $i-4$-й или $i-3$-й, см. раздел 3.1.1.4). Этот факт, хотя и известен, но ему не придают того значения, которое он имеет в рамках нашего подхода (см. гл. 8, 9). Кроме того, встречаются, и довольно часто, водородные связи боковых цепей между собой, в пределах витка α-спирали или между соседними цепями β-слоя. Конкретные примеры таких связей будут рассмотрены в девятой главе.

3.5. Первичная структура белков

3.5.1. Подходы к предсказанию вторичной структуры белков на основе их первичной структуры. Как мы определили в разделе 3.1.2.1, первичная структура — это линейная последовательность звеньев в цепном полимере. Интуитивно ясно, что именно в ней заложена вся информация, необходимая для формирования структур более высокого порядка. Это нашло подтверждение в известных опытах по ренатурации фермента рибонуклеазы [179]. Естественным было попытаться по первичной структуре предсказывать места расположения на вторичных структур — участков со спиральной и растянутой конформацией. Однако чтобы предсказывать, нужно знать основные закономерности формирования вторичных структур. В процессе поиска этих закономерностей наметились несколько основных путей в решении проблем предсказания.

Во первых, это анализ аминокислотного состава в α-спиральных и β-структурных фрагментах белков и возможного влияния соседних аминокислот на формирование вторичной структуры. К этому подходу, называемому статистическим, относятся работы [179–188], характеризующие, в основном, наиболее ранний этап решения этой проблемы.

Во вторых, белки представляют собой полимеры, к которым применимы методы физики полимеров. При этом обращают внимание на особенности конформации полимеров, в предположении, что стабильные конформации должны иметь минимум свободной энергии. К этим методам примыкают и формальные методы описания структуры боковых цепей, их стереохимию, а также расчеты конформации полипептидных цепей методами квантовой химии *ab initio* (с самого начала). Этот подход, к которому относятся работы [189–193] можно условно назвать структурным.

В третьих, применение к белкам методов компьютерного анализа по распознаванию образов, в частности, метода нейронных сетей, составило еще одно направление для предсказания вторичной структуры белков [194–196].

В четвертых, благодаря успехам в изучении структуры белков методом РСА можно предсказывать, используя аналогии, структуру белков, близких по происхождению или функциям. Этот подход, основанный на аналогии структур, на первых порах весьма ограниченный [197–199], в последние годы приобретает все большее значение, так как количество информации о белках и программ по их компьютерной обработке постоянно растет (см. след. раздел). Более детально описание ряда методов предсказания вторичной структуры белков можно найти в монографиях [1, 2].

Тем на менее, несмотря использование всего арсенала современной физики и вычислительной математики и определенный прогресс (точность предсказания доходит до 80%), проблема *правильного*, т. е. абсолютного точного предсказания вторичной структуры белка так и остается нерешенной. И дело здесь не в недостатке числа методов, а как мы увидим в этой книге (гл. 8 и 9), в недостаточно правильном взгляде на белки и их природу, т. е. все дело в методологии и парадигме.

3.5.2. Понятие «мотива» и его использование в анализе белковых цепей. Первичные структуры можно рассматривать в качестве одномерной проекции трехмерной структуры на линейную цепь белка. По этой причине многие особенности третичной структуры в своеобразном виде представлены на этой проекции. Так, аминокислоты, участвующие в связывании какого-либо кофактора (или субстрата), либо обеспечивающие формирование прочных межмолекулярных комплексов, стабилизируются в процессе эволюции. Белковые фрагменты, обеспечивающие формирование участка связывания, будут иметь строго определенный размер, ограниченную вариабельность аминокислот, а аминокислоты, участвующие в процессе узнавания, будут занимать строго определенное место на этом фрагменте и становятся, до известной степени, консервативными. Эти соображения могут служить теоретическим основанием к выявлению на белковых структурах своеобразных мотивов (sequence motif).

С появлением большого числа расшифрованных первичных структур белков (особенно после внедрения методов секвенирования кодирующих их полинуклеотидных цепей [200]) с неизвестными функциями поставила задачу их идентификации и поиска гомологии с уже известными белками, а также выявления специфических белковых «мотивов». Примером такого исследования, число которых в настоящее время очень велико, может служить анализ 34 последовательностей белка тубулина. [201]. Ниже приведены два мотива, найденные в этих белках (рис. 3.3).

Мотивы бывают вероятностными и дискретными. Вероятностные мотивы обычно представляются как матрицы вероятностей, известные в некоторых применениях как позиционно-специфичные матрицы вероятностей [201], профили [202], или взвешенные матрицы [203]. Эти матрицы содержат вероятности (scores), которые выражают вероятность нахождения различных аминокислот в каждом положении последовательности.

В отличие от этого, дискретные мотивы или паттерны, являются регулярными конструкциями, в которых выявляются специфические остатки или группы консервативных остатков в выровненном блоке [204–207]. Показанный на рис. 3.3 блок относится к дискретным мотивам. Наиболее интересные в функциональном отношении аминокислоты обычно находятся в именно мотивах.

В настоящее время предложено большое количество программ, осуществляющих поиск мотивов и «выравнивание» белковых последовательностей [208–214]. Этот подход можно рассматривать в качестве одного из способов предсказания структуры белков (на основе найденных гомологий с другими белками).

3.6. Проблема самоорганизации структуры белков

Проблема, вынесенная в заголовок этого раздела, в более узком смысле понимается как проблема фолдинга, т. е. сворачивания полипептидной цепи в третичную

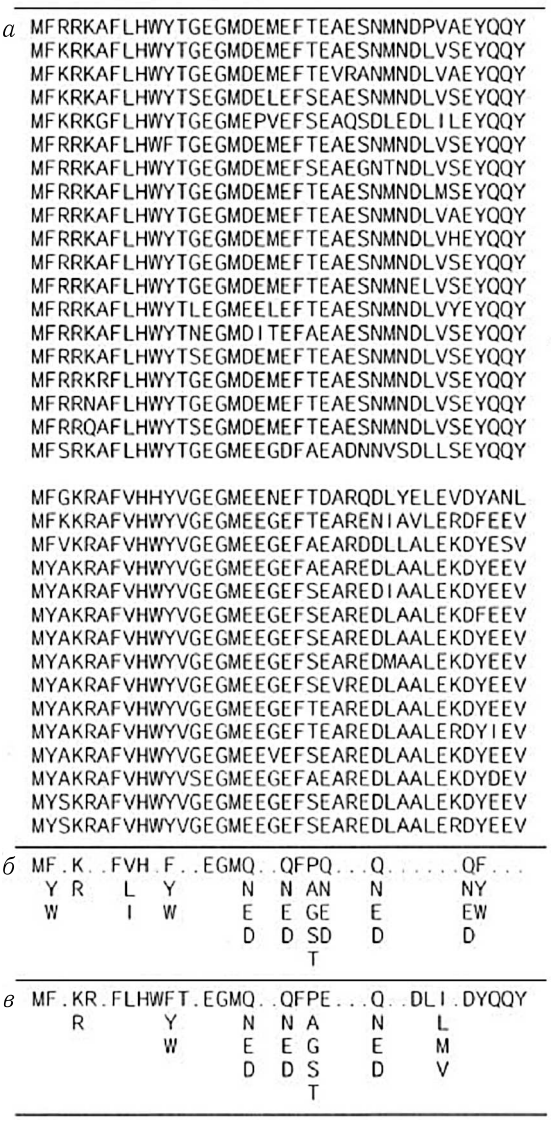


Рис. 3.3. Выровненный блок из 34 белков тубулина [201] и два мотива, найденные в этих белках (*a*). Вариации аминокислот, выявленные в блоке (*b*, *c*)

структуру. Однако, как мы полагаем, ее нужно понимать именно как проблему самоорганизации, поскольку на молекулярном уровне нет «субъектов», которые бы обеспечивали процесс сворачивания белковой цепи и осуществляли его контроль.

3.6.1. Модели сворачивания белков. Вспомним известный парадокс Левинталя [215]. Он состоит в том, количество возможных конформаций, которые может принимать белок, бесконечно велико. Для цепи из 100 остатков их количество составляет, что по его подсчетам, 10^{100}. При условии затраты 10^{-13} сек. на одну конформацию, простой перебор всех конформаций, в поиске единственно возможной,

занял бы 10^{80} лет, что превышает время жизни нашей Вселенной. Если принять во внимание, что на самом деле процесс формирования функционального белка составляет доли секунды, то возникает вопрос: как разрешают этот парадокс сами белковые молекулы. Вероятно, в природе есть механизмы, которые обходят прямой перебор всех конформаций и ведут к быстрому результату — самоорганизации белка. К настоящему времени предложено несколько моделей фолдинга.

Модель нуклеации-роста. Одной из ранних моделей по сворачиванию белка явилась модель нуклеации — роста [216], которая предполагала, что третичная структура быстро распространяется от начального ядра вторичной структуры. Однако эта модель не предполагала наличия интермедиатов сворачивания, чем вошла в противоречие с появившимися в скором времени данными о существовании таких промежуточных продуктов [217, 218]. Вследствие этого она не получила дальнейшего развития.

Каркасная (*framework*) *модель*. В рамках этой модели, впервые предложенной в работе [219] и развиваемой в работах [217–221] предполагается, что вначале формируется вторичная структура, за которой следует стыковка предварительно сформированной вторичной структуры и образование нативного сложенного белка. Каркасная модель получила свое подтверждение в основном из работ, проведенных с небольшими, относительно стабильными спиральными пептидами [221–223]. Эти структуры могут представлять начальную точку для складывания, так что такой фолдинг может происходить из денатурированного состояния с высоким содержанием вторичной структуры.

Модель гидрофобного коллапса. Важнейшую роль в самоорганизации белка эта модель [224] отводит гидрофобным взаимодействиям [29], роль которых подробно рассматривалась в разделе 3.1.1.2. Она предполагает, что складыванию белка способствует гидрофобный коллапс, при котором сложенный белок занимает ограниченный объем, что сужает поиски конформаций, соответствующих его нативному состоянию. Однако, идея о том, что конформационный поиск ускоряется внутри неспецифической гидрофобной глобулы имеет ряд трудностей, так как избыток взаимодействий будет затруднять реорганизацию как полипептидной цепи, так и боковых цепей. Возможным решением возникших трудностей явилось предположение о том, что одним из промежуточных состояний белковой структуры является «расплавленная глобула» [225]. Предполагается, что в процессе коллапсирования происходит формирование вторичной структуры, которое останавливается где-то на полпути к формированию окончательной структуры и далее идет медленный процесс ее «отвердевания», сопровождающийся окончательным формированием всех связей. В пользу идеи «середины пути» могут служить данные работы [226]. На основе изучения конформационных свойств более сорока фрагментов, находящихся в нативном или частично сложенном состояниях, авторы показали, что в них отсутствуют промежуточные продукты, у которых нет вторичной структуры или присутствуют протяженные упорядоченные структуры. Таким образом, возможно их нахождение в равновесном промежуточном состоянии.

Модель нуклеации–конденсации. Появление этой модели было обусловлено фактами, которые необъяснимы с позиции других моделей. На примере ингибитора химитрипсина было показано, что белки могут складываться путем простой двухфазной кинетики, без накопления промежуточных продуктов сворачивания [227]. Кроме того, на том же объекте было найдено, что вторичная и третичная структуры обра-

зуются параллельно, по мере того, как белок претерпевает общий коллапс [228]. Эти работы привели к формулированию модели нуклеации-конденсации (или нуклеации-коллапса) [229–231], объединяющей свойства, как механизма гидрофобного коллапса, так и каркасного. Нуклеация — конденсация включает образование дальних и других гидрофобных взаимодействий в переходных состояниях для стабилизации исходно слабой вторичной структуры. Как в большинстве белков, в переходных состояниях образуются стабильные укладки благодаря комбинации дальних третичных взаимодействий и вторичной структуры. Изолированные элементы повторяющейся вторичной структуры, такие как α-спирали и β-шпильки, имеют тенденцию к слабым конформационным предпочтениям в отсутствие остальной части белка и стабилизируются третичными взаимодействиями, которые осуществляет остальная часть белка. Переходное состояние напоминает искаженную форму нативной структуры, с наименее искаженной частью в виде ядра и искажением, имеющим тенденцию увеличиваться с увеличением расстояния от ядра.

Существуют и другие, менее популярные модели сворачивания белка, например модель «белкового квартета», включающая описание четырех типов конформационных состояний [232].

3.6.2. Ко-трансляционный механизм сворачивания белков. Приведенные выше модели, до недавнего времени конкурировавшие между собой за право описывать процесс сворачивания белка, существенно утратили свои позиции в связи с появлением новых данных о структуре рибосом и детальных исследований процесса синтеза белка. Именно по этой причине мы выделили данный механизм в отдельный параграф. Напомним, что рибосомы, надмолекулярные структуры, осуществляющие биосинтез белка (в общем виде он изложен в разделе 2.2.5), состоят из двух субчастиц: малой (30S) и большой (50S) и обе являются комплексами нуклеиновых кислот и большого числа белков. Исследования структуры рибосом, проводимые уже в течение длительного времени, показали, что малые субчастицы являются центрами декодирования, в которых происходит узнавание между кодонами информационной РНК и соответствующими антикодонами т-РНК [233, 234]. С другой стороны, образование пептидной связи происходит в пептидил-трансферазном центре (ПТЦ) большой рибосомной субчастицы. [235–237]. Различные участки связывания т-РНК, называемые А-, Р- и Е-участками, расположены в пространстве между большой и малой субчастицами [238]. Наиболее интересные результаты, существенным образом уточняющие наши представления о процессе синтеза и сворачивания белка, связаны с большой субчастицей. В ее структуре найден протяженный канал (рибосомный выходной туннель), которой проходит через всю большую субчастицу (рис. 3.4.) [239]. Он имеет протяженность порядка 100 Å и диаметр — 10–20 Å [240, 241]. Стенки канала построены из нуклеотидов рибосомной РНК и ряда белков. Поверхность туннеля обеспечивает минимизацию неблагоприятных контактов с растущим синтезируемым белком, и вследствие этого вдоль стенок канала отсутствуют значительные гидрофобные области. Выход из туннеля фланкирован двумя специальными рибосомными белками и открывается только на момент выхода очередного звена полипептидной цепи. Таким образом, туннель вместе с частью синтезированного белка изолирован от внешней среды [237]. Размер туннеля таков, что уже в процессе продвижения по нему готовой части белка может иметь место частичное формирование его вторичной структуры.

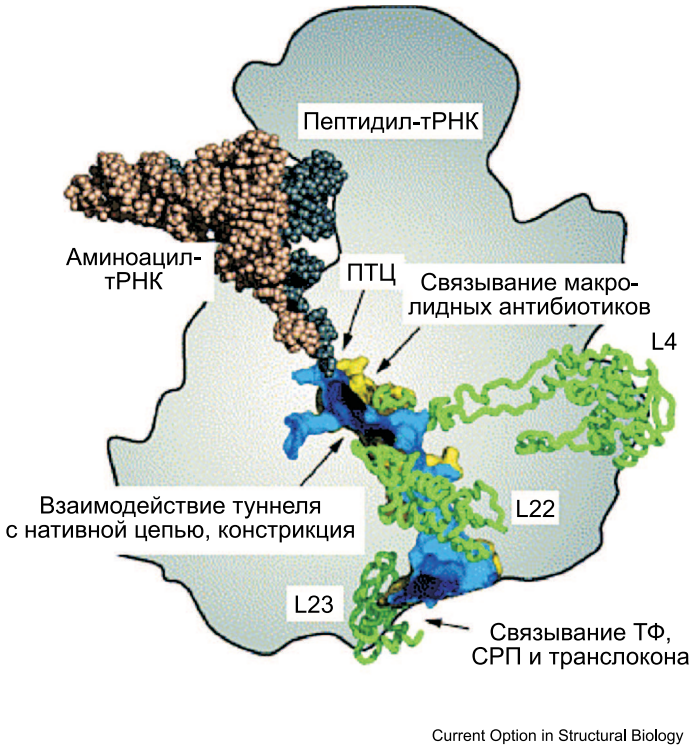


Рис. 3.4. Синтез белка и путь, совершаемый полипептидной цепью в рибосомном туннеле (по [239]). Показаны различные состояния т-РНК (аминоацил-т-РНК, петидил-т-РНК), ряд рибосомных белков — L4, L22, L23, расположенных вблизи канала и формирующих его стенки, и участки действия макролидных антибиотиков. Белок L23 на выходе из канала опосредует взаимодействие нативного белка, выходящего из рибосомы, с шаперонами цитоплазмы

Дополнительно к этому, на выходе из рибосомы в ряде случаев, например, в E. coli, показано наличие триггерного фактора, связанного с одним из белков рибосом, который ко-трансляционно реагирует с только что синтезированным белком [242, 243]. Этот фактор относится к классу шапейронов, белков, выполняющих вспомогательную функцию в процессе сворачивания белков.

Таким образом, не вдаваясь в подробности, можно сказать, что условия для сворачивания белка, как оно наблюдается в живой природе, существенно отличаются от условий, в которых проводится моделирование процесса фолдинга *in vitro*. Весь процесс сворачивания белка, по-видимому, находится под контролем клеточных структур, что, естественно, полностью гарантирует правильное его складывание.

Имеются данные [244], что в ряде случаев процесс ко-трансляционной самоорганизации белка напоминает формирование снежного кома или наматывание нити на клубок, имеющий «затравку» в виде клочка бумаги. До определенного момента, когда белок гемоглобин синтезирован менее чем на две трети, процесс присоединения гема к белку возможен, а выше этой величины — уже нет (доступная область закрывается вновь синтезированной частью белковой цепи). Справедливости ради следует отметить, что модель нуклеации-конденсации [231], согласно которой переходное

состояние напоминает нативную структуру (с более-менее сформированным ядром и искаженным состоянием, которое увеличивается с увеличением расстояния от ядра), если исключить идеологические установки, по сути, вполне может подходить к описанию состояний белка в процессе его ко-трансляционного сворачивания.

3.6.3. Обсуждение проблемы самоорганизации биополимеров. Приведенные в разделе 3.6.2 результаты показывают, что во взглядах современных исследователей на процесс самоорганизации имеется ряд пробелов и несоответствий с экспериментальными данными. Перечислим те элементы принятой в настоящее время парадигмы, которые связаны с моделями фолдинга (самоорганизации) белков:

— белок формируется только после того, как он полностью синтезирован;

— движущей силой самоорганизации является окружающая среда (гидрофобные и гидрофильные взаимодействия);

— полипептидная цепь рассматривается большей частью как случайная последовательность аминокислот (слегка отредактированный статистический полимер) [245];

— окончательный вид белок принимает самостоятельно, без участия внешних сил.

А теперь посмотрим, к какой парадигме приводит исследование реального процесса синтеза белка:

— белок формируется ко-трансляционно, в процессе его синтеза;

— в процессе синтеза и частичного формирования его структуры полипептидная цепь изолирована от внешней среды;

— каждая аминокислота участвует в процессе ко-трансляционного складывания белка;

— в окончательном формировании белковой структуры часто принимают участие вспомогательные белки — шаперойны, способные к транспорту белка к месту его функционирования.

Таким образом, образовалась пропасть между «пробирочными» взглядами на процессы самоорганизации белков и теми реальными фактами, которые дают современные данные по исследованию процесса биосинтеза белка. Наличие ко-трансляционного механизма сворачивания белка, по нашему мнению, снимает большую часть проблем самоорганизации белка. Он показывает, что процесс первичного формирования белковой структуры идет под прямым воздействием специфических белков рибосомы на основе отработанных миллионами лет механизмов. Это должно обеспечивать высокую степень надежности формирующейся структуры, поскольку в противном случае биосистемы не могли бы существовать. Этот механизм ставит вопрос о существовании определенной системы свойств, которыми должны обладать боковые цепи аминокислот и сама полипептидная цепь, чтобы такая сборка под действием рибосомы могла происходить однозначно.

Вернемся теперь к разделу 1.4, посвященному анализу закономерного характера перехода от микроэлектроники к бионическим наноструктурам. Мы анализировали в нем статью [246]. Идея организации синтеза интегральных структур без участия оператора привела к следующими элементам:

— линейности цепи ячеек из ν элементов, пространственное расположение которых соответствует последовательности технологических операций;

— самоорганизации элементов по мере последовательного присоединения;

— необходимости устройства сканирования матрицы (N^*-шаблона).

Сопоставление с современными данными по синтезу белка показывает, что чисто инженерный подход по своим установкам оказался очень близок к этому механизму. Однако эти установки идут дальше: в работе [246] обсуждается характер топологического кода (максимальное число кодируемых элементов равно 64, основание кода $N = 4$) и тип топологического кодирования (двухступенчатое). Как мы увидим в главах 8 и 9, на основе теоретического анализа сформирован взгляд на генетический код как на систему топологического кодирования, в рамках которой боковые цепи аминокислот образуют систему физических операторов, воссоздающих в процессе взаимодействия с полипептидной цепью закодированную структуру белка. Как нам представляется, развитая модель топологического кодирования цепных полимеров как нельзя лучше соответствует современным представлениям о важной роли рибосомы в формировании структуры белка. Таким образом, инженерный подход и в этом случае оказался продуктивным в применении к биоструктурам, рассматриваемым нами как предельный случай молекулярной электроники.

Литература к главе 3

1. *Шульц Г.*, *Ширмер Р.* Принципы структурной организации белков / Пер. с англ. — М.: Мир, 1982. — 354 с.
2. *Финкельштейн А.В.*, *Птицын О.Б.* Физика белка. — М.: Книжный дом «Университет», 2002. — 376 с.
3. *Perutz M.F.* New x-ray evidence on the configuration of polypeptide chains // Nature. 1951. V. 167. P. 1053–1054.
4. *Dill K.A.* Dominant forces in protein folding // Biochemistry. 1990. V. 29. P. 7133–7155.
5. *Creghton T.E.* Proteins: Structure and Molecular Properties / 2-nd ed. W.H. Freeman. — N. Y., 1993.
6. *Moore J.S.*, *Nelson J.C.*, *Prince B.* Conformational order of nonbiological oligomers in solution: molecular design principles // In: Conjugated oligomers, polymers and dendrimers: from polyacetylene to DNA / Ed. J.-L. Brédas. — Brussels: De Boeck Université, 1999. P. 263–290.
7. *Arakawa T.*, *Tokunaga M.* Electrostatic and hydrophobic interactions play a major role in the stability and refolding of halophilic proteins // Protein Pept Lett. 2004 V. 11. P. 125–32.
8. *Scheidig A.J.*, *Burmester C.*, *Goody R.S.* The pre-hydrolysis state of P. 21^{ras} in complex with GTP: new insights into the role of water molecules in the GTP hydrolysis reaction of Ras-like proteins // Structure. Fold Des. 1999. V. 7. P. 1311–1324.
9. *Careri G.* Collective effects in hydrated proteins // In: Hydration Processes in Biology: Theoretical and Experimental Approaches (Bellisent-Funel M.C., Ed.) — IOS Press, 1999. P. 143–155.
10. *Mattos C.*, *Ringe D.* Proteins in organic solvents // Curr. Opin. Struct. Biol. 2001. V. 11. P. 761–764.
11. *Pace C.N.*, *Trevino S.*, *Prabhakaran E.*, *Scholtz J.M.* Protein structure, stability and solubility in water and other solvents // Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 2004. V. 359. P. 1225–34.
12. *Denisov V.P.*, *Jonsson B.H.*, *Halle B.* Hydration of denatured and molten globule proteins // Nat. Struct. Biol. 1999. V. 6. P. 253–260.
13. *Zaccai G.*, *Eisenberg H.* Halophilic proteins and the influence of solvent on protein stabilization // Trends Biochem. Sci. 1990. V. 15. P. 333–337.
14. *Schiffer C.A.*, *Dotsch V.* The role of protein-solvent interactions in protein unfolding // Curr. Opin. Biotechnol. 1996. V. 7. P. 428–432.
15. *Loris R.*, *Langhorst U.*, *De Vos S.*, *Decanniere K.*, *Bouckaert J.*, *Maes D.*, *Transue T.R.*, *Steyaert J.* Conserved water molecules in a large family of microbial ribonucleases // Proteins. 1999. V. 36. P. 117–134.
16. *Tarek M.*, *Tobias D.* Environmental dependence of the dynamics of protein hydration water // J. Am. Chem. Soc. 1999. V. 121. P. 9740–9741.
17. *Nagendra H.G.*, *Sukumar N.*, *Vijayan M.* Role of water in plasticity, stability, and action of proteins: the crystal structures of lysozyme at very low levels of hydration // Proteins. 1998. V. 32. P. 229–240.
18. *Langhorst U.*, *Backmann J.*, *Loris R.*, *Steyaert J.* Analysis of water mediated protein–protein interactions within RNase T. 1 // Biochemistry. 2000. V. 39. P. 6586–6593.

19. *Ebel C.*, *Zaccai G.* Crowding in extremophiles: linkage between solvation and weak protein-protein interactions, stability and dynamics, provides insight into molecular adaptation // J. Mol. Recognit. 2004. V. 17. P. 382–389.
20. *Janin J.* Wet and dry interfaces: the role of solvent in protein–protein and protein–DNA recognition // Struct. Fold. Des. 1999. V. 7. P. R277–R279.
21. *Palomer A.*, *Perez J.J.*, *Navea S.*, *Llorens O.*, *Pascual J.*, *Garcia L.*, *Mauleon D.* Modeling cyclooxygenase inhibition. Implication of active site hydration on the selectivity of ketoprofen analogues // J. Med. Chem. 2000. V. 43. P. 2280–2284.
22. *Mattos C.* Protein–water interactions in a dynamic world // Trends Bioch. Sci. 2002. V. 27. P. 203–208.
23. *Mattos C.*, *Ringe D.* Solvent structure // In: International Tables for Crystallography F (Eds. M. G. Rossman, E. Arnold), Kluwer–Academic, 2001. P. 623–640.
24. *Nakasako M.* Water-protein interactions from high-resolution protein crystallography // Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 2004. V. 359. P. 1191–1204.
25. *Tsai M.L.*, *Liaw S.H.*, *Chang N.C.* The crystal structure of Ym1 at 1.31 Åresolution // J. Struct. Biol. 2004. V. 148. P. 290–296.
26. *Sanjeev B.S.*, *Vishveshwara S.* Protein-water interactions in ribonuclease A and angiogenin: a molecular dynamics study // Proteins. 2004. V. 55. P. 915–923.
27. *Munishkina L.A.*, *Henriques J.*, *Uversky V.N.*, *Fink A.L.* Role of protein-water interactions and electrostatics in alpha-synuclein fibril // Biochemistry. 2004. V. 43. P. 3289–3300.
28. *Kauzmann W.* Some factors in the interpretation of protein denaturation // Adv. Protein Chem. 1959. V. 14. P. 1–63.
29. *Aurora R.*, *Rose G.D.* Helix capping // Protein Sci. 1998. V. 7. P. 21–38.
30. *Tcherkasskaya O.*, *Sanders W.*, *Chynwat V.*, *Davidson E.A.*, *Orser C.S.* The role of hydrophobic interactions in amyloidogenesis: example of prion-related polypeptides // J. Biomol. Struct. Dyn. 2003. V. 21. P. 353–65.
31. *Murray K.B.*, *Gorse D.*, *Thornton J.M.* Wavelet transforms for the characterization and detection of repeating motifs // J. Mol. Biol. 2002. V. 316. P. 341–363.
32. *Arakawa T.*, *Tokunaga M.* Electrostatic and hydrophobic interactions play a major role in the stability and refolding of halophilic proteins // Protein Pept. Lett. 2004. V. 11. P. 125–132.
33. *Cavagnero S.*, *Nishimura C.*, *Schwarzinger S.*, *Dyson H.J.*, *Wright P.E.* Conformational and dynamic characterization of the molten globule state of an apomyoglobin mutant with an altered folding pathway // Biochemistry. 2001. V. 40. P. 14459–14467.
34. *Rothwarf D.M.*, *Scheraga H.A.* Role of non-native aromatic and hydrophobic interactions in the folding of hen egg white lysozyme // Biochemistry. 1996. V. 35. P. 13797–13807.
35. *Crowley P.B.*, *Otting G.*, *Schlarb-Ridley B.G.*, *Canters G.W.*, *Ubbink M.* Hydrophobic interactions in a cyanobacterial plastocyanin-cytochrome f complex // J. Am. Chem. Soc. 2001. V. 123. P. 10444–10453.
36. *Chalikian T.V.* Hydrophobic tendencies of polar groups as a major force in molecular recognition // Biopolymers. 2003. V. 70. P. 492–496.
37. *Li H.*, *Tang C.*, *Wingreen N.S.* Are protein folds atypical? — Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1998. V. 95. P. 4987–4990.
38. *Butcher D.J.*, *Moe G.R.* Role of hydrophobic interactions and desolvation in determining the structural properties of a model alpha beta peptide // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1996. V. 93. P. 1135–1140.
39. *Ventura S.*, *Serrano L.* Designing proteins from the inside out // Proteins. 2004. V. 56. P. 1–10.
40. *Singer S.J.*, *Nicolson G.L.* The fluid mosaic model of vstructure of cell membranes // Science. 1972. V. 175. P. 720–731.

41. *Lange C.*, *Nett J.H.*, *Trumpower B.L.*, *Hunte C.* Specific roles of protein-phospholipid interactions in the yeast cytochrome bc_1 complex structure // EMBO J. 2001. V. 20. P. 6591–600.
42. *Dumas F.*, *Lebrun M.C.*, *Tocanne J.F.* Is the protein / lipid hydrophobic matching principle relevant to membrane organization and functions? // FEBS Lett. 1999. V. 458. P. 271–277.
43. *de Planque M.R.*, *Killian J.A.* Protein-lipid interactions studied with designed transmembrane peptides: role of hydrophobic matching and interfacial anchoring // Mol. Membr. Biol. 2003. V. 20. P. 271–284.
44. *Richards F.M.* Areas, volumes, packing and protein structures // Annu. Rev. Biophys. Bioeng. 1977. V. 21. P. 252–281.
45. *Wickoff H.W.* Compensating nature of substitutions in pancreatic ribonucleases // Brookhaven Sym. Biol. 1968. V. 21. P. 252–281.
46. *Lee A.G.* How lipids affect the activities of integral membrane proteins // Biochim. Biophys. Acta. 2004. V. 1666. P. 62–87.
47. *Stickle D.F.*, *Presta L.G.*, *Dill K.A.*, *Rose G.D.* Hydrogen bonding in globular proteins // J. Mol. Biol. 1992. V. 226. P. 1143–1159.
48. *Richardson J.S.*, *Richardson D.C.* Amino acid preferences for specific locations at the ends of alpha helices // Science. 1988. V. 240. P. 1648–1652.
49. *Karplus P.A.*, *Schulz G.E.* Refined structure of glutathione reductase at 1.54 angstroms resolution // J. Mol. Biol. 1987. V. 195. P. 701–729.
50. *Rowland P.*, *Bjornberg O.*, *Nielsen F.S.*, *Jensen K.F.*, *Larsen S.* The crystal structure of Lactococcus lactis dihydroorotate dehydrogenase a complexed with the enzyme reaction product throws light on its enzymatic function // Protein Sci. 1998. V. 7. P. 1269–1279.
51. *Cho H.*, *Ramaswamy S.*, *Plapp B.V.* Flexibility of liver alcohol dehydrogenase in stereoselective binding of 3-butylthiolane 1-oxides // Biochemistry. 1997. V. 36. P. 382–389.
52. *Kelly C.A.*, *Nishiyama M.*, *Ohnishi Y.*, *Beppu T.*, *Birktoft J.J.* Determinants of protein thermostability observed in the 1.9 angstroms crystal structure of malate dehydrogenase from the thermophilic bacterium Thermus flavus // Biochemistry. 1993. V. 32. P. 3913–3922.
53. *Marsh D.*, *Pali T.* The protein-lipid interface: perspectives from magnetic resonance and crystal structures // Biochim. Biophys. Acta. 2004. V. 1666. P. 118–141.
54. *Nakamura H.* Roles of electrostatic interaction in proteins // Q. Rev. Biophys. 1996. V. 29. P. 1–90.
55. *Smith J.S.*, *Scholtz J.M.* Energetics of polar side-chain interactions in helical peptides: salt effects on ion pairs and hydrogen bonds // Biochemistry. 1998. V. 37. P. 33–40.
56. *Gandini D.*, *Gogioso L.*, *Bolognesi M.*, *Bordo D.* Patterns in ionizable side chain interactions in protein structures // Proteins. 1996. V. 24. P. 439–49.
57. *Stapley B.J.*, *Doig A.J.* Hydrogen bonding interactions between glutamine and asparagine in alpha-helical peptides // J. Mol. Biol. 1997. V. 272. P. 465–473.
58. *Avbelj F.*, *Fele L.* Role of main-chain electrostatics, hydrophobic effect and side-chain conformational entropy in determining the secondary structure of proteins // J. Mol. Biol. 1998. V. 279. P. 665–684.
59. *Avbelj F.* Amino acid conformational preferences and solvation of polar backbone atoms in peptides and proteins // J. Mol. Biol. 2000. V. 300. P. 1335–1359.
60. *Hendsch Z.S.*, *Tidor B.* Do salt bridges stabilize proteins? A continuum electrostatic analysis // Protein Sci. 1994. V. 3. P. 211–226.
61. *Careri G.* Cooperative charge fluctuations by migrating protons in globular proteins // Prog. Biophys. Mol. Biol. 1998. V. 70. P. 223–249.
62. *Marqusee S.*, *Sauer R.T.* Contributions of a hydrogen bond / salt bridge network to the stability of secondary and tertiary structure in lambda repressor // Protein Sci. 1994. V. 3. P. 2217–2225.

63. *Pauling L.*, *Corey R.B.*, *Branson H.R.* The structure of proteins. Two hydrogen-bonded helical configurations of the polypeptide chain // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1951. V. 37. P. 205–211.
64. *Pauling L.*, *Corey R.B.* The pleated sheet, a new configuration of polypeptide chain // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1951. V. 37. P. 205–256.
65. *Holmes M.A.*, *Matthews B.W.* Structure of thermolysin refined at 1.6 Åresolution // J. Mol. Biol. 1982. V. 160. P. 623–639.
66. *Murthy M.R.*, *Reid T.J.* 3rd, Sicignano A., Tanaka N., Rossmann M.G. Structure of beef liver catalase // J. Mol. Biol. 1981. V. 152. P. 465–499.
67. *Svensson-Ek M.*, *Abramson J.*, *Larsson G.*, *Tornroth S.*, *Brezezinski P.*, *Iwata S.* The X-ray crystal structures of wild-type and eq(I-286) mutant cytochrome c oxidases from Rhodobacter sphaeroides — J. Mol. Biol. 2002. V. 321. P. 329–339.
68. *Tsukada H.*, *Blow D.M.* Structure of α-chymotrypsin refined at 1.68 angstroms resolution // J. Mol. Biol. 1985. V. 184. P. 703–711.
69. *Hegde R.S.*, *Grossman S.R.*, *Laimins L.A.*, *Sigler P.B.* Crystal structure at 1.7 angstroms of the bovine papillomavirus-1 e2 DNA-binding domain bound to its DNA target // Nature. 1992. V. 359. P. 505–512.
70. *Larson S.B.*, *Day J.*, *Greenwood A.*, *McPherson A.* Refined structure of satellite tobacco mosaic virus at 1.8 Å resolution // J. Mol. Biol. 1998. V. 277. P. 37–59.
71. *Redžic J.S.*, *Bowler B.E.* Role of hydrogen bond networks and dynamics in positive and negative cooperative stabilization of a protein // Biochemistry. 2005. V. 44. P. 2900–2908.
72. *Cordier F.*, *Gržesiek S.* Quantitative comparison of the hydrogen bond network of A-state and native ubiquitin by hydrogen bond scalar couplings // Biochemistry. 2004. V. 43. P. 11295–11301.
73. *Kursula I.*, *Partanen S.*, *Lambeir A.M.* Wierenga R / K. The importance of the conserved Arg191-Asp227 salt bridge of triosephosphate isomerase for folding, stability, and catalysis // FEBS Lett. 2002. V. 518. P. 39–42.
74. *Peters D.*, *Peters J.* The ribbon of hydrogen bonds and the pseudomolecule in the three-dimensional structure of globular proteins. III. Bovine pancreatic ribonuclease A and bovine seminal ribonuclease // Biopolymers. 2002. V. 65. P. 347–353.
75. *Peters D.*, *Peters J.* The ribbon of hydrogen bonds in globular proteins. IV. The example of the papain family // Biopolymers. 2004. V. 73. P. 178–191.
76. *Файн А.В.*, *Березовский И.Н.*, *Чехов В.О.*, *Украинский Д.Л.*, *Есипова Н.Г.* Двойная и вилочковая водородные связи в α-спиралях глобулярных белков // Биофизика. 2001. Т. 46. С. 969–977.
77. *Курганов Б.И.*, *Любарев А.Е.* Проблемы биохимической организации // Биохимия. 1991. Т. 56. С. 19–32.
78. *Cho H.*, *Ramaswamy S.*, *Plapp B.V.* Flexibility of liver alcohol dehydrogenase in stereoselective binding of 3-butylthiolane 1-oxides // Biochemistry. 1997. V. 36. 382–389.
79. *Auerbach G.*, *Ostendorp R.*, *Prade L.*, *Korndorfer I.*, *Dams T.*, *Huber R.*, *Jaenicke R.* Lactate dehydrogenase from the hyperthermophilic bacterium Thermotoga maritima: the crystal structure at 2.1 Å resolution reveals strategies for intrinsic protein stabilization // Structure. (London). 1998. V. 6. P. 769–781.
80. *Monod J.*, *Wyman J.*, *Changeux J.-P.* On the nature of allosteric transitions: A plausible model // J. Mol. Biol. 1965. V. 12, № 1. P. 88–118.
81. *Hanson K.R.* Enzyme symmetry and enzyme stereospecificity // Annu. Rev. Plant Physiol. 1972. V. 23. P. 335–366.
82. *Goodsell D.S.*, *Olson A.J.* Structural symmetry and protein function // Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 2000. V. 29. P. 105–153.

83. *Blundell T.L.*, *Srinivasan N.* Symmetry, stability, and dynamics of multidomain and multicomponent protein systems // Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 1996. V. 93. P. 14243–14248.
84. *Watson J.D.*, *Crick F.H.C.* Molecular structure of nucleic acid. A structure for deoxyribose nucleic acid // Nature. 1953. V. 171. P. 737–738.
85. Leach DR. Long DNA palindromes, cruciform structures, genetic instability and secondary structure repair // Bioessays. 1994. V. 16. P. 893–900.
86. *Pabo C.O.*, *Sauer R.T.* Protein-DNA recognition // Annu. Rev. Biochem. 1984. V. 53. P. 293–321.
87. *Winkler F.K.*, *Banner D.W.*, *Oefner C.*, *Tsernoglou D.*, *Brown R.S.*, *Heathman S.P.*, *Bryan R.K.*, *Martin P.D.*, *Petratos K.*, *Wilson K.S.* The crystal structure of Eco RV endonuclease and of its complexes with cognate and noncognate dna fragments // EMBO J. 1993. V. 12. P. 1781–1795.
88. *Suto R.K.*, *Edayathumangalam R.S.*, *White C.L.*, *Melander C.*, *Gottesfeld C.*, *Dervan P.B.*, *Luger K.* Crystal structures of nucleosome core particles in complex with minor groove DNA-binding ligands // J. Mol. Biol. 2003. V. 326. P. 371–380.
89. *Rowland P.*, *Bjornberg O.*, *Nielsen F.S.*, *Jensen K.F.*, *Larsen S.* The crystal structure of Lactococcus lactis dihydroorotate dehydrogenase a complexed with the enzyme reaction product throws light on its enzymatic function // Protein Sci. 1998. V. 7. P. 1269–1279.
90. *Fita I.*, *Rossmann M.G.* The NADPH binding site on beef liver catalase // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1985. V. 82. P. 1604–1608.
91. *Xiao G.*, *Liu S.*, *Ji X.* Johnson WW, Chen J, Parsons JF, Stevens WJ, Gilliland GL, Armstrong RN. First-sphere and second-sphere electrostatic effects in the active site of a class mu gluthathione transferase // Biochemistry. 1996. V. 35. P. 4753–4765.
92. *Davenport R.C.*, *Bash P.A.*, *Seaton B.A.*, *Karplus M.*, *Petsko G.A.*, *Ringe D.* Structure of the triosephosphate isomerase-phosphoglycolohydroxamate complex: an analogue of the intermediate on the reaction pathway // Biochemistry. 1991. V. 30. P. 5821–5826.
93. *Brick P.*, *Blow D.M.* Crystal structure of a deletion mutant of a tyrosyl-t-RNA synthetase complexed with tyrosine // J. Mol. Biol. 1987. V. 194. P. 287–297.
94. *Fermi G.*, *Perutz M.F.*, *Shaanan B.*, *Fourme R.* The crystal structure of human deoxyhaemoglobin at 1.74 angstroms resolution // J. Mol. Biol. 1984. V. 175. P. 159–174.
95. *Gao X.*, *Wen X.*, *Esser L.*, *Quinn B.*, *Yu L.*, *Yu C.-A.*, *Xia D.* Structural basis for the quinone reduction in the bc(1) complex: a comparative analysis of crystal structures of mitochondrial cytochrome bc(1) with bound substrate and inhibitors at the q(i) site // Biochemistry. 2003. V. 42. P. 9067–9080.
96. *Tsukihara T.*, *Shimokata K.*, *Katayama Y.*, *Shimada H.*, *Muramoto K.*, *Aoyama H.*, *Mochizuki M.*, *Shinzawa-Itoh K.*, *Yamashita E.*, *Yao M.*, *Ishimura Y.*, *Yoshikawa S.* The low-spin heme of cytochrome c oxidase as the driving element of the proton-pumping process // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 2003. V. 100. P. 15304–15309.
97. *Stein P.E.*, *Boodhoo A.*, *Armstrong G.D.*, *Cockle S.A.*, *Klein M.H.*, *Read R.J.* The crystal structure of pertussis toxin structure // Nature (London). 1994. V. 2. P. 45–57.
98. *Olsen J.G.*, *Kadziola A.*, *Von Wettstein-Knowles P.*, *Siggaard-Andersen M.*, *Larsen S.* Structures of beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthase I complexed with fatty acids elucidate its catalytic machinery // Structure. (Camb.). 2001. V. 9. P. 233–243.
99. *Ealick S.E.*, *Rule S.A.*, *Carter D.C.*, *Greenhough T.J.*, *Babu Y.S.*, *Cook W.J.*, *Habash J.*, *Helliwell J.R.*, *Stoeckler J.D.*, *Parks R.D. Jr.* Chen S.F., Bugg C.E. Three-dimensional structure of human erythrocytic purine nucleoside phosphorylase at 3.2 Å resolution. J. Biol. Chem. 1990. V. 265. P. 1812–1820.
100. *Weiss M.S.*, *Wacker T.*, *Weckesser J.*, *Welte W.*, *Schulz G.E.* The three-dimensional structure of porin from Rhodobacter capsulatus at 3 Åresolution // FEBS Lett. 1990. V. 267. P. 268–272.

101. *Bell B.J.*, *Watanabe L.*, *Rios-Steiner J.L.*, *Tulinsky A.*, *Lebioda L.*, *Arni R.K.* Structure of 2-keto-3-deoxy-6-phosphogluconate (KDPG) aldolase from Pseudomonas putida. – Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr. 2003. V. 59.P. 1454–1458.
102. *Varghese J.N.*, *Laver W.G.*, *Coleman P.M.* Structure of the influenza virus glycoprotein antigen neuraminidase at 2.9 Åresolution. – Nature, 1983 V. 303. P. 35–40.
103. *Shrive A.K.*, *Cheetham G.M.T.*, *Holden D.*, *Myles D.A.A.*, *Turnell W.G.*, *Volanakis J.E.*, *Pepys M.B.*, *Bloomer A.C. Greenhough T.J.* Three dimensional structure of human C-reactive // Nat. Struct. Biol. 1996. V. 3. P. 346–354.
104. *Spangler B.D.*, *Westbrook E.M.* Crystallization of isoelectrically homogeneous cholera toxin // Biochemistry. 1989. V. 28(3). P. 1333–1340.
105. *Antson A.A.*, *Dodson E.J.*, *Dodson G.G.* Circular assemblies // Curr. Opin. Struct. Biol. 1996. V. 6. P. 142–150.
106. *Diaz-Avalos R.*, *Caspar D.L.* Hyperstable stacked-disk structure of tobacco mosaic virus protein: electron cryomicroscopy image reconstruction related to atomic models // J. Mol. Biol. 2000. V. 297. P. (1):67–72.
107. *Bouckaert J.*, *Hamelryck T.*, *Wyns L.*, *Loris R.* The crystal structures of man(alpha1–3)man(alpha1- O)me and man(alpha1–6)man(alpha1-O)me in complex with concanavalin A // J. Biol. Chem. 1999. V. 274. P. 29188–29195.
108. *Stein P.E.*, *Leslie A.G. W.*, *Finch J.T.*, *Carrell R. W.* Crystal structure of uncleaved ovalbumin at 1.95 angstroms resolution // J. Mol. Biol. 1991. V. 221. P. 941–959.
109. *Shen Y.Q.*, *Song S.Y.*, *Lin Z.J.* Structures of D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase complexed with coenzyme analogues // Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr. 2002. V. 58. P. 1287–1297.
110. *Razeto A.*, *Kochhar S.*, *Hottinger H.*, *Dauter M.*, *Wilson K.S.*, *Lamzin V.S.* Domain closure, substrate specificity and catalysis of D-lactate dehydrogenase from Lactobacillus bulgaricus // J. Mol. Biol. 2002. V. 318. P. 109–119.
111. *Larsen T.M.*, *Laughlin L.T.*, *Holden H.M.*, *Rayment I.*, *Reed G.H.*. Structure of rabbit muscle pyruvate kinase complexed with Mn2+, K+, and pyruvate // Biochemistry. 1994. V. 33. P. 6301–6309.
112. *Rigden D.J.*, *Alexeev D.*, *Phillips S.E.*, *Fothergill-Gilmore L.A.* The 2.3 A X-ray crystal structure of S. cerevisiae phosphoglycerate mutase // J. Mol. Biol. 1998. V. 276. P. 449–59.
113. *Stenkamp R.E.*, *Sieker L.C.*, *Jensen L.H.*, *McQueen J.E. Jr.* Structure of methemerythrin at 2.8-Angstrom resolution: computer graphics fit of an averaged electron density map // Biochemistry. 1978. V. 17. P. 2499–2504.
114. *Stieglitz K.A.*, *Dusinberre K.J.*, *Cardia J.P.*, *Tsuruta H.*, *Kantrowitz E.R.* Structure of the E. coli aspartate transcarbamoylase trapped in the middle of the catalytic cycle // J. Mol. Biol. 2005. V. 352. P. 478–86.
115. *Lawrence M.C.*, *Suzuki E.*, *Varghese J.N.*, *Davies P.C.*, *Van Donkelaar A.*, *Tulloch P.A.*, *Coleman P.M.* The three-dimensional structure of the seed storage protein phaseolin at 3 Åresolution // EMBO J. 1990. V. 9. P. 9–15.
116. *Hoy T.G.*, *Harrison P.M.*, *Hoare R.J.* A tetragonal crystal form of horse spleen apoferritin and its relationship to the cubic modification // J. Mol. Biol. 1974. V. 86. P. 301–308.
117. *Glaser R.* I-symmetry, the highest chiral point group, and the icosahedral structure of virus particles // Enantiomer. 1997. V. 2. P. 479–483.
118. *Dokland T.* Freedom and restraint: themes in virus capsid assembly // Structure. 2000. V. 8. P. R157–R162.
119. *Pederson D.M.*, *Welsh L.C.*, *Marvin D.A.*, *Sampson M.*, *Perham R.N.*, *Yu M.*, *Slater M.R.* The protein capsid of filamentous bacteriophage P. H75. from Thermus thermophilus // J. Mol. Biol. 2001. V. 309. P. 401–421.

120. *Liu D.J.*, *Day L.A.* Pf1 virus structure: helical coat protein and DNA with paraxial phosphates // Science. 1994. V. 265. P. 671–674.
121. *Welsh L.C.*, *Symmons M.F.*, *Marvin D.A.* The molecular structure and structural transition of the alpha-helical capsid in filamentous bacteriophage Pf1 // Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr. 2000. V. 56. P. 137–150.
122. *Moody M.F.* Geometry of phage head construction // J. Mol. Biol. 1999. V. 293. P. 401–433.
123. *Ishikawa T.*, *Wakabayashi T.* Proposal of alignment-independent classification of electron microscopic images with helical symmetry and its application to reconstituted thin filaments of skeletal muscle // Ultramicroscopy. 1995. V. 57. P. 91–101.
124. *Al-Khayat H.A.*, *Morris E.P.*, *Squire J.M.* Single Particle Analysis: A new approach to solving the 3D structure of myosin filaments // J. Muscle Res. Cell Motil. 2004. V. 25. P. 635–644.
125. *Trachtenberg S.*, *Fishelov D.*, *Ben-Artzi M.* Bacterial flagellar microhydrodynamics: Laminar flow over complex flagellar filaments, analog archimedean screws and cylinders, and its perturbations // Biophys. J. 2003. V. 85. P. 1345–1357.
126. *Yonekura K.*, *Maki-Yonekura S.*, *Namba K.* Building the atomic model for the bacterial flagellar filament by electron cryomicroscopy and image analysis // Structure. 2005. V. 13. P. 407–412.
127. *Страйер Л.* Биохимия. В 3-х томах / Пер. с англ. — М.: Мир, 1985. Т. 3. — 397 с.
128. *Sept D.*, *Baker N.A.*, *McCammon J.A.* The physical basis of microtubule structure and stability // Protein Sci. 2003. V. 12. P. 2257–2261.
129. *Jia L.*, *Moorjani S.G.*, *Jackson T.N.*, *Hancock W.O.* Microscale transport and sorting by kinesin molecular motors // Biomed Microdevices. 2004. V. 6. P. 67–74.
130. *Harris J.R.*, *Holzenburg A.* Human erythrocyte catalase: 2-D crystal nucleation and production of multiple crystal forms // J. Struct. Biol. 1995. V. 115. P. 102–112.
131. *Taylor K.A.*, *Taylor D.W.* Formation of two-dimensional complexes of F-actin and crosslinking proteins on lipid monolayers: demonstration of unipolar alpha-actinin-F-actin crosslinking // Biophys. J. 1994. V. 67. P. 1976–1983.
132. *Sleytr U.B.*, *Messner P.*, *Pum D.*, *Sara M.* Crystalline Bacterial Cell Surface Proteins. — San Diego: Academic Press, 1996.
133. *Simon P.*, *Lichte H.*, *Wahl R.*, *Mertig M.*, *Pompe W.* Electron holography of non-stained bacterial surface layer proteins // Biochim. Biophys. Acta. 2004. V. 1663. P. 178–187.
134. *Henderson R.*, *Unwin P.N.T.* Three-dimensional model of purple membrane obtained by electron microscopy // Nature. 1975. V. 257. P. 29–32.
135. *Unwin P.N.T.*, *Henderson R.* Molecular structure determination by electron microscopy of unstained crystalline specimens // J. Mol. Biol. 1975. V. 94. P. 425–440.
136. *Henderson R.*, *Baldwin J.M.*, *Ceska T.A.*, *Zemlin F.*, *Beckmann E.*, *Downing K.H.* Model for the structure of bacteriorhodopsin based on high-resolution electron cryo-microscopy // J. Mol. Biol. 1990. V. 213. P. 899–929.
137. *Kunji E.R.*, *Spudich E.N.*, *Grisshammer R.*, *Henderson R.*, *Spudich J.L.* Electron crystallographic analysis of two-dimensional crystals of sensory rhodopsin II: a 6.9 Å projection structure // J. Mol. Biol. 2001. V. 308. P. 279–293.
138. *Davies A.*, *Gowen B.E.*, *Krebs A.M.*, *Schertler G.F.*, *Saibil H.R.* Three-dimensional structure of an invertebrate rhodopsin and basis for ordered alignment in the photoreceptor membrane // J. Mol. Biol. 2001. V. 314. P. 455–463.
139. *Schertler G.F.*, *Hargrave P.A.* Projection structure of frog rhodopsin in two crystal forms // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1995. V. 92. P. 11578–11582.
140. *Krebs A.*, *Edwards P.C.*, *Villa C.*, *Li J.*, *Schertler G.F.* The three-dimensional structure of bovine rhodopsin determined by electron cryomicroscopy // J. Biol. Chem. 2003. V. 278. P. 50217–50225.

141. *Williams K.A.* Three-dimensional structure of the ion-coupled transport protein NhaA // Nature. 2000. V. 403. P. 112–115.
142. *Conroy M.J., Jamieson S.J., Blakey D., Kaufmann T., Engel A., Fotiadis D., Merrick M., Bullough P.A.* Electron and atomic force microscopy of the trimeric ammonium transporter AmtB // EMBO Rep. 2004. V. 5. P. 1153–1158.
143. *Stuart M.C., Koning R.I., Oostergetel G.T., Brisson A.* Mechanism of formation of multilayered 2D crystals of the enzyme IIC-mannitol transporter. Biochim. Biophys. Acta. 2004. V. 1663. P. 108–116.
144. *Nanatani K., Ohonishi F., Yoneyama H., Nakajima T., Abe K.* Membrane topology of the electrogenic aspartate-alanine antiporter AspT of Tetragenococcus halophilus // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2005. V. 328. P. 20–26.
145. *Cyrklaff M., Auer M., Kuhlbrandt W., Scarborough G.A.* 2-D structure of the Neurospora crassa plasma membrane ATPase as determined by electron cryomicroscopy // EMBO J. 1995. V. 14. P. 1854–1857.
146. *Hebert H., Purhonen P., Vorum H., Thomsen K., Maunsbach A.B.* Three-dimensional structure of renal Na,K-ATPase from cryo-electron microscopy of two-dimensional crystals // J. Mol. Biol. 2001. V. 314. P. 479–494.
147. *Weis R.M., Hirai T., Chalah A., Kessel M., Peters P.J., Subramaniam S.* Electron microscopic analysis of membrane assemblies formed by the bacterial chemotaxis receptor Tsr // J. Bacteriol. 2003. V. 185. P. 3636–3643.
148. *Yin C.C., Han H., Wei R., Lai F.A.* Two-dimensional crystallization of the ryanodine receptor Ca2+ release channel on lipid membranes // J. Struct. Biol. 2005. V. 149. P. 219–224.
149. *Ringler P., Borgnia M.J., Stahlberg H., Maloney P.C., Agre P., Engel A.* Structure of the water channel AqpZ from Escherichia coli revealed by electron crystallography // J. Mol. Biol. 1999. V. 291. P. 1181–1190.
150. *Ren G., Cheng A., Melnyk P., Mitra A.K.* Polymorphism in the packing of aquaporin-1 tetramers in 2-D crystals // J. Struct. Biol. 2000. V. 130. P. 45–53.
151. *Stahlberg H., Braun T., de Groot B., Philippsen A., Borgnia M.J., Agre P., Kuhlbrandt W., Engel A.* The 6.9-A structure of GlpF: a basis for homology modeling of the glycerol channel from Escherichia coli // J. Struct. Biol. 2000. V. 132. P. 133–141.
152. *Hankamer B., Barber J., Boekema E.J.* Structure and membrane organization of photosystem II in green plants // Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 1997. V. 48. P. 641–671.
153. *Akiba T., Toyoshima C., Matsunaga T., Kawamoto M., Kubota T., Fukuyama K., Namba K., Matsubara H.* Three-dimensional structure of bovine cytochrome bc1 complex by electron cryomicroscopy and helical image reconstruction // Nat. Struct. Biol. 1996. V. 3. P. 553–561.
154. *Levy D., Chami M., Rigaud J.L.* Two-dimensional crystallization of membrane proteins: the lipid layer strategy // FEBS Lett. 2001. V. 504. P. 187–193.
155. *Rigaud J.L.* Membrane proteins: functional and structural studies using reconstituted proteoliposomes and 2-D crystals. Braz // J. Med. Biol. Res. 2002. V. 35. P. 753–766.
156. *Degani Y., Degani C.* Further evidence for nonsymmetric subunit association and intersubunit cooperativity in creatine kinase. Subunit-selective modifications by 2,4-dinitrophenylthiocyanate // J. Biol. Chem. 1980. V. 255. P. 8221–8228.
157. *Карасев В.А., Стефанов В.Е., Курганов Б.И.* Надмолекулярные биоструктуры: организация, функционирование, происхождение // В кн.: Итоги науки и техники. Сер. Биол. химия. Т. 31. — М.: ВИНИТИ, 1989. — 199 с.
158. *Блюменфельд Л.А.* Проблемы биологической физики. — М.: Наука, 1977. — 336 с.
159. *Bello J.* Tight packing of protein cores and interfaces. Relation to conservative amino acid sequences and stability of protein-protein interaction // Int. J. Peptide and Protein Res. 1978. V. 12. P. 38–41.

160. *Chothia C.*, *Janin J.* Principles of protein-protein recognition // Nature. 1975. V. 256. P. 705–708.
161. *Rossman M.G.*, *Liljas A.* Letter: Recognition of structural domains in globular proteins // J. Mol. Biol. 1974. V. 85. P. 177–181.
162. *Remington S.*, *Wiggand G.*, *Huber R.* Crystallographic refinement and atomic models of two different forms of citrate synthase at 2.7 and 1.7 Åresolution // J. Mol. Biol. 1982. V. 158. P. 111–152.
163. *Cohen G.H.*, *Silverston E.W.*, *Davies D.R.* Refined crystal structure of gamma-chymotrypsin at 1.9 Åresolution. Comparison with other pancreatic serine proteases // J. Mol. Biol. 1981. V. 148. P. 449–479.
164. *Lijnzaad P.*, *Argos P.* Hydrophobic patches on protein subunit interfaces: characteristics and prediction // Proteins. 1997. V. 28. P. 333–343.
165. *Larsen T.A.*, *Olson A.J.*, *Goodsell D.S.* Morphology of protein-protein interfaces // Structure. 1998. V. 6. P. 421–427.
166. *Yu B.*, *Paroutis P.*, *Davidson A.R.*, *Howell P.L.* Disruption of a salt bridge dramatically accelerates subunit exchange in duck delta2 crystallin // J. Biol. Chem. 2004. V. 279. P. 40972–40979.
167. *Monod J.*, *Wyman J.*, *Changeux J.P.* On the nature of allosteric transitions: a plausible model // J. Mol. Biol. 1965. V. 12. P. 88–118.
168. *Morgan R.S.*, *Miller S.L.*, *McAdon J.M.* The symmetry of self-complementary surfaces // J. Mol. Biol. 1979. V. 127. P. 31–38.
169. *Chothia C.* One thousand families for the molecular biologist // Nature. 1993. V. 357. P. 543–544.
170. *Thornton J.M.*, *Orengo C.A.*, *Todd A.E.*, *Pearl F.M.* Protein folds, functions and evolution // J. Mol. Biol. 1999. V. 293. P. 333–342.
171. *Orengo C.A.*, *Michie A.D.*, *Jones S.*, *Jones D.T.*, *Swindells M.B.*, *Thornton J.M.* CATH — a hierarchic classification of protein domain structures // Structure. 1997. V. 5. P. 1093–1108.
172. *Murzin A.G.*, *Brenner S.E.*, *Hubbard T.*, *Chothia C.* SCOP: a structural classification of proteins database for the investigation of sequences and structures // J. Mol. Biol. 1995. V. 247. P. 536–540.
173. *Holm L.*, *Sander C.* Dali / FSSP classification of three-dimensional protein folds // Nucleic Acids Res. 1997. V. 25. P. 231–234.
174. *Hadley C.*, *Jones D.T.* A systematic comparison of protein structure classification SCOP, CATH and FSSP // Structure. 1995. V. 7. P. 1099–1112.
175. *Richardson J.S.* Beta-Sheet topology and the relatedness of proteins // Nature. 1977. V. 268. P. 495–500.
176. *Hou J.*, *Sims G.E.*, *Zhang C.*, *Kim S.H.* A global representation of the protein fold space // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2003. V. 100. P. 2386–2390.
177. *Taylor W.R.* A ′periodic table′ for protein structures // Nature. 2002. V. 416. P. 657–660.
178. *Кантор Ч.*, *Шиммел П.* Биофизическая химия. Т. 1. — М.: Мир, 1984. С. 104–105.
179. *Anfinsen C.B.* On the possibility of predicting tertiary structure from primary sequence // In: New perspectives in biology (Ed. M. Sela). — American Elsevier, 1964. P. 42–50.
180. *Chou P.Y.*, *Fasman G.D.* Prediction of protein conformation // Biochemistry. 1974. V. 13. P. 222–245.
181. *Beghin F.*, *Dirks J.* Une methode statistique simple de prediction des conformations proteiques // Arch. Int. Physiol. Biochem. 1975. V. 83. P. 167–168.
182. *Periti P.F.* Bayesian approach to the recognition of discrete patterns with an applications to a problem of protein molecular structure // Bull. Chim. Pharm. 1974. V. 113. P. 187–218.

183. *Garnier J.*, *Osguthorpe D.J.*, *Robson B.* Analysis of the accuracy and implications of simple methods for predicting the secondary structure of globular proteins // J. Mol. Biol. 1978. V. 120. P. 97–120.
184. *Gibrat J.-F.*, *Garnier J.*, *Robson B.* Further developments of protein secondary structure prediction using information theory. New parameters and consideration of residue pairs // J. Mol. Biol. 1987. V. 198. P. 425–443.
185. *Wu T.T.*, *Kabat E.A.* An attempt to locate the non-helical and permissively helical sequences of proteins: Application to the variable regions of immunoglobulin light and heavy chains // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1971. V. 68. P. 1501–1506.
186. *Nagano K.* Triplet information in helix prediction applied to the analysis of supersecondary structures // J. Mol. Biol. 1977. V. 109. P. 251–274.
187. *Kuntz I.D.* An approach to the tertiary structure of globular proteins // J. Amer. Chem. Soc. 1972. V. 94. P. 4009–4012.
188. *Palau J.*, *Puigdomenech P.* The structural code for proteins: Zonal distribution of amino acids residues and stabilisation of helices by hydrophobic triplets // J. Mol. Biol. 1974. V. 88. P. 457–469.
189. *Tanaka S.*, *Scheraga H.A.* Statistical mechanical treatment of protein conformation. III. Prediction of protein conformation based on a three-state model // Macromolecules. 1976. V. 9. P. 168–182.
190. *Scheraga H.A.* Recent progress in the theoretical treatment of protein folding // Biopolymers. 1983. V. 22. P. 1–14.
191. *Ptitsyn O.B.*, *Finkelstein A.V.* Theory of protein secondary structure and algorithm of its prediction // Biopolymers. 1983. V. 22. P. 15–25.
192. *Lim V.I.* Structural principles of globular organisation of protein chains. A stereochemical theory of globular secondary structure // J. Mol. Biol. 1974. V. 88. P. 857–872.
193. *Bonneau R.*, *Tsai J.*, *Ruczinski I.*, *Baker D.* Functional inferences from blind ab initio protein structure predictions // J. Struct. Biol. 2001. V. 134. P. 186–90.
194. *Qian N.*, *Sejnowski T.J.* Predicting the secondary structure of globular proteins using neural network models // J. Mol. Biol. 1988. V. 202. P. 865–884.
195. *Stolorz P.*, *Lapedes A.*, *Xia Y.* Predicting protein secondary structure using neural net and statistical methods // J. Mol. Biol. 1992. V. 225. P. 363–377.
196. *Frishman D.*, *Argos P.* Recognition of distantly related protein sequences using conserved motifs and neural networks // J. Mol. Biol. 1992. V. 228. P. 951–962.
197. *Nishikava K.*, *Ooi T.* Amino acid sequence homology applied to the prediction of protein secondary structures, and joint prediction with existing methods // Biochim. Biophys. Acta. 1986. V. 871. P. 45–54.
198. *Levin J.M.*, *Robson B.*, *Garnier J.* An algorithm for secondary structure determination in proteins based on sequence similarity // FEBS Lett. 1986. V. 205. P. 303–308.
199. *Sweet R.M.* Evolutionary similarity among peptide segments is a basis for prediction of protein folding // Biopolymers. 1986. V. 25. P. 1565–1577.
200. *Franca L.T.*, *Carrilho E.*, *Kist T.B.* A review of DNA sequencing techniques // Q. Rev. Biophys. 2002. V. 35. P. 169–200.
201. *Nevill-Manning C.G.*, *Wu T.D.* Brutlag,D.L. Highly specific protein sequence motifs for genome analysis // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1998. V. 95. P. 5865–5871.
202. *Henikoff S.* Scores for sequence searches and alignments // Curr. Opin. Struct. Biol. 1996. V. 6. P. 353–360.
203. *Gribskov M.*, *McLachlan A.D.*, *Eisenberg D.* Profile analysis: detection of distantly related proteins // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1987. V. 84. P. 4355–4358.
204. **204.** Staden R. Searching for patterns in protein and nucleic acid sequences // Methods Enzymol. 1990. V. 183. P. 193–211.

205. *Nevill-Manning C.G.*, *Sethi K.S.*, *Wu T.D.*, *Brutlag D.L.* Enumerating and ranking discrete motifs // Proceedings of the International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology. 1997. V. 5. P. 202–209.
206. *Falquet L.*, *Pagni M.*, *Bucher P.*, *Hulo N.*, *Sigrist C.J.*, *Hofmann K.*, *Bairoch A.* The PROSITE database, its status in 2002 // Nucleic Acids Res. 2002. V. 30. 235–238.
207. *Parry-Smith D.J.*, *Attwood T.K.* SOMAP: a novel interactive approach to multiple protein sequences alignment // Comput. Appl. Biosci. 1991. V. 7. P. 233–235.
208. *Faulkner D.V.*, *Jurka J.* Multiple aligned sequence editor (MASE) // Trends Biochem. Sci. 1988. V. 13. P. 321–322.
209. *Galtier N.*, *Gouy M.*, *Gautier C.* SEAVIEW and PHYLO_WIN: two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny // Comput. Appl. Biosci. 1996. V. 12. P. 543–548.
210. *Barton G.J.* ALSCRIPT: a tool to format multiple sequence alignments // Protein Eng. 1993. V. 6. P. 37–40.
211. **211.** Brown N.P., Leroy C., Sander C. MView: a web-compatible database search or multiple alignment viewer // Bioinformatics. 1998. V. 14. P. 380–381.
212. *Goodstadt L.*, *Ponting C.P.* CHROMA: consensus-based colouring of multiple alignments for publication // Bioinformatics. 2001. V. 17. P. 845–846.
213. *Lord P.W.*, *Selley J.N.*, *Attwood T.K.* CINEMA-MX: a modular multiple alignment editor // Bioinformatics. 2002. V. 18. P. 1402–1403.
214. *Bennett S.P.*, *Lu L.*, *Brutlag D.L.* 3matrix and 3motif: a protein structure visualization system for conserved sequence motifs // Nucleic Acids Res. 2003. V. 31. P. 3328–3332.
215. *Levinthal C.* Are there pathways for protein folding? — J. Chim. Phys. 1968. V. 65. P. 44–45.
216. *Wetlaufer D.B.* Nucleation, rapid folding, and globular intrachain regions in proteins // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1973. V. 70. P. 697–701.
217. *Kim P.S.*, *Baldwin R.L.* Specific intermediates in the folding reactions of small proteins and the mechanism of protein folding // Annu. Rev. Biochem. 1982. V. 51. P. 459–89.
218. *Ptitsyn O.B.* Protein folding: hypotheses and experiments // J. Protein Chem. 1987. V. 6. P. 273–293.
219. *Ptitsyn O.B.*, *Rashin A.A.* A model of myoglobin self-organization // Biophys. Chem. 1975. V. 3. P. 1–20.
220. *Kim P.S.*, *Baldwin R.L.* Intermediates in the folding reactions of small proteins // Annu. Rev. Biochem. 1990. V. 59. P. 631–660.
221. *Brown J.E.*, *Klee W.A.* Helix–coil transition of the isolated amino terminus of ribonuclease // Biochemistry. 1971. V. 10. P. 470–476.
222. *Bierzynski A.*, *Kim P.S.*, *Baldwin R.L.* A salt bridge stabilizes the helix formed by isolated C-peptide of RNase A // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1982. V. 79. P. 2470–2474.
223. *Shoemaker K.R.*, *Kim P.S.*, *Brems D.N.*, *Marqusee S.*, *York E.J.*, *Chaiken I.M.*, *Stewart J.M.*, *Baldwin R.L.* Nature of the charged-group effect on the stability of the C-peptide helix // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1985. V. 82. P. 2349–2353.
224. *Baldwin R.L.* How does protein folding get started? — Trends Biochem. Sci. 1989. V. 14. P. 291–294.
225. *Ptitsyn O.B.* Structures of folding intermediates // Curr. Opin. Struct. Biol. 1995. V. 5. P. 74–78.
226. *Uversky V.N.*, *Fink A.L.* The chicken–egg scenario of protein folding revisited // FEBS Lett. 2002. V. 515. P. 79–83.
227. *Jackson S.E.*, *Fersht A.R.* Folding of chymotrypsin inhibitor 2. 1. Evidence for a two-state transition // Biochemistry. 1991. V. 30. P. 10428–10435.
228. *Otzen D.E.*, *Itzhaki L.S.* el Masry N.F., Jackson S.E., Fersht A.R. Structure of the transition state for the folding / unfolding of the barley chymotrypsin inhibitor 2 and its implications for mechanisms of protein folding // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1994. V. 91. P. 10422–10425.

229. *Fersht A.R.* Optimization of rates of protein folding: the nucleation-condensation mechanism and its implications // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1995. V. 92. P. 10869–10873.
230. *Fersht A.R.* Nucleation mechanisms in protein folding // Curr. Opin. Struct. Biol. 1997. V. 7. P. 3–9.
231. *Daggett V.*, *Fersht A.R.* Is there a unifying mechanism for protein folding? // Trends Biochem. Sci. 2003. V. 28. P. 18–25.
232. *Uversky V.N.* Natively unfolded proteins: a point where biology waits for physics // Protein Sci. 2002. V. 11. P. 739–56.
233. *Wimberly B.T.*, *Brodersen D.E.* Clemons W.M.Jr., Morgan-Warren R.J., Carter A.P., Vonrhein C., Hartsch T., Ramakrishnan V. Structure of the 30S ribosomal subunit // Nature. 2000. V. 407. P. 327–339.
234. *Schluenzen F.*, *Tocilj A.*, *Zarivach R.*, *Harms J.*, *Gluehmann M.*, *Janell D.*, *Bashan A.*, *Bartels H.*, *Agmon I.*, *Franceschi F. et al.* Structure of functionally activated small ribosomal subunit at 3.3 angstroms resolution // Cell. 2000. V. 102. P. 615–623.
235. *Ban N.*, *Nissen P.*, *Hansen J.*, *Moore P.B.*, *Steitz T.A.* The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution // Science. 2000. V. 289. P. 905–920.
236. *Harms J.*, *Schluenzen F.*, *Zarivach R.*, *Bashan A.*, *Gat S.*, *Agmon I.*, *Bartels H.*, *Franceschi F.*, *Yonath A.* High resolution structure of the large ribosomal subunit from a mesophilic eubacterium // Cell. 2001. V. 107. P. 679–688.
237. *Gilbert R.J.*, *Fucini P.*, *Connell S.*, *Fuller S.D.*, *Nierhaus K.H.*, *Robinson C.V.*, *Dobson C.M.*, *Stuart D.I.* Three-dimensional structures of translating ribosomes by Cryo-EM // Mol. Cell. 2004. V. 14. P. 57–66.
238. *Yusupov M.M.*, *Yusupova G.Z.*, *Baucom A.*, *Lieberman K.*, *Earnest T.N.*, *Cate J.H.*, *Noller H.F.* Crystal structure of the ribosome at 5.5 Å resolution // Science. 2001. V. 292. P. 883–896.
239. *Jenni S.*, *Ban N.* The chemistry of protein synthesis and voyage through the ribosomal tunnel // Curr. Opin. Struct. Biol. 2003. V. 13. P. 212–219.
240. *Gabashvili I.S.*, *Gregory S.T.*, *Valle M.*, *Grassucci R.*, *Worbs M.*, *Wahl M.C.*, *Dahlberg A.E.*, *Frank J.* The polypeptide tunnel system in the ribosome and its gating in erythromycin resistance mutants of L4 and L22 // Mol. Cell. 2001. V. 8. P. 181–188.
241. *Spahn C.M.*, *Beckmann R.*, *Eswar N.*, *Penczek P.A.*, *Sali A.*, *Blobel G.*, *Frank J.* Structure of the 80S ribosome from *Saccharomyces cerevisiae*–tRNA–ribosome and subunit-subunit interactions // Cell. 2001. V. 107. P. 373–386.
242. *Albanese V.*, *Frydman J.* Where chaperones and nascent polypeptides meet // Nat. Struct. Biol. 2002. V. 9. P. 716–718.
243. *Kramer G.*, *Rauch T.*, *Rist W.*, *Vorderwulbecke S.*, *Patzelt H.*, *Schulze-Specking A.*, *Ban N.*, *Deuerling E.*, *Bukau B.* L23 protein functions as a chaperone docking site on the ribosome // Nature. 2002. V. 419. P. 171–174.
244. Kolb. V.A., Makeyev E.V., Spirin A.S., 2000. Co-translational folding of an eukaryotic multidomain protein in a prokaryotic translation system // J. Biol Chem. V. 275. P. 16597–16601.
245. *Птицын О.Б.*, *Финкельштейн А.В.*, *Добсон С.М.* Самоорганизация белковых структур — мост между физикой и биологией // Мол. биол. 1999. Т. 33. С. 1012–1015.
246. *Дорфман В.Ф.* О топологической разрешимости интегральных структур без совмещений // Микроэлектроника. 1975. Т. 4, вып. 3. С. 213–219.

Глава 4

МЕХАНИЗМЫ ПЕРЕНОСА ЭНЕРГИИ И ЗАРЯДОВ В БИОСТРУКТУРАХ

Вопрос о механизмах переноса зарядов, доставляющих энергию для работы биологических надмолекулярных структур, является наиболее принципиальным. Первоначально планировалось излагать его в той же третьей главе, как это было сделано ранее в работе [1], поскольку мы полагаем, что организация надмолекулярных структур и их работа, связанная с переносом зарядов, вещи взаимосвязанные. Такой анализ дает многое для понимания и того и другого. Однако, за прошедшие с момента выхода работы [1] годы объем структурной информации настолько возрос, что для проблем переноса энергии и зарядов пришлось выделить отдельную главу, которую мы рекомендуем читать после изучения третьей главы. Имеющийся в литературе материал можно разделить на два больших подраздела: экспериментальные подходы к проблеме и теоретические подходы. Хотя это разделение весьма условно, поскольку и эксперименты базируются на неких теоретических воззрениях, и теоретические подходы неизменно проверяются экспериментами, оно вносит некоторый порядок в большое число разнородных направлений. Отметим также, что основной акцент в нашем рассмотрении будет сделан на анализе предлагаемых механизмов переноса зарядов и возможности их использования для целей конструирования бионических наносистем.

4.1. Экспериментальные подходы к изучению биоэнергетики

Среди экспериментальных подходов к проблеме переноса энергии и зарядов в биоструктурах сложилось несколько различных направлений. Каждое из них имеет свою систему взглядов и свой язык описания. Рассмотреть все подходы вряд ли возможно и целесообразно. В данном разделе будут рассмотрены три основных группы подходов:

— биоэнергетическое направление, нацеленное на изучение механизмов трансформации энергии процессов дыхания и фотосинтеза в энергию макроэргических связей молекул АТФ. В качестве основных объектов использует, в основном, биомембраны и мембранные комплексы;

— исследование физических механизмов дальнего переноса электронов, проводимое, как правило, на отдельных белках;

— анализ механизмов дальнего переноса энергии и зарядов в ДНК.

Последнее направление имеет особый интерес со стороны специалистов в области наноэлектроники, поскольку молекулы ДНК считаются наиболее перспективными для создания молекулярных компьютеров

4.1.1. Биоэнергетическое направление. Это направление возникло в рамках биохимии.

4.1.1.1. ***Краткая характеристика биоэнергетического направления.*** Термин «биоэнергетика» имеет два толкования. В широком его понимании все проблемы, связанные с переносом энергии и зарядов в биоструктурах, относят к биоэнергетике. Однако, имеется и более узкое его толкование. Оно рассматривает данное направление как исследование в структурах, осуществляющих окисление или фотосинтез, процессов переноса зарядов (электронов и протонов), сопряженных с синтезом молекул АТФ. Именно в этом смысле будет использоваться термин «биоэнергетика» в данной главе.

Совокупность идей и походов, развивавшихся в первую очередь биохимиками, выделилась в самостоятельную науку «биоэнергетику» к началу 70-х годов прошлого века. Наибольшее внимание обращали при этом на исследование процессов, идущих в клеточных мембранах. Развитие биоэнергетики происходило синхронно с мембранологией, изучением структуры биомембран и мембранных белков (см. гл. 11). В настоящее время эти исследования все более приобретают молекулярный характер.

Теоретической основой биоэнергетики явилась хемиосмотическая концепция, которая впервые была сформулирована в работах П. Митчелла [2–4]. Согласно этим работам, система переноса электронов, расположенная в биомембране, создает в ней градиент электрохимического потенциала протонов ($\Delta\mu_H^+$), который состоит из двух слагаемых: $\Delta\psi$ — электрического потенциала, заряжающего мембрану, и ΔpH — градиента концентрации протонов по обе стороны мембраны. Мембранный потенциал ($\Delta\mu_H^+$) иначе еще называют протонодвижущей силой (ПДС). Донорами энергии в этом процессе могут служить как окисление субстратов кислородом, так и фотолиз воды под действием света. По определению электрохимического потенциала (схема 4.1)

$$\Delta\mu_H^+ = \mathrm{F}\cdot\Delta\psi + 2{,}3\mathrm{R}\,T\cdot\Delta\mathrm{pH} \qquad (4.1)$$

где F — число Фарадея, R — постоянная Ридберга, T — абсолютная температура (°K). Образующийся градиент электрохимического потенциала $\Delta\mu_H^+$ используется для синтеза АТР из АДР и неорганического фосфата ($\mathrm{P_н}$). При этом, по Митчеллу, могут быть использованы как $\Delta\psi$, так и ΔpH составляющие $\Delta\mu_H^+$. Помимо градиента концентрации протонов, мембраны могут создавать градиенты концентрации ионов (Na^+, K^+), которые также служат для запасания потенциальной энергии. В целом $\Delta\mu_H^+$ рассматривается как универсальная форма запасания и передачи энергии в биоструктурах.

Развитие хемиосмотической концепции происходило в постоянной борьбе с альтернативными взглядами, существовавшими в период становления биоэнергетики, такими как концепция «энергизованного» протона Р. Вильямса [5], концепция спаренного сопряжения Д. Грина [6] и рядом других, подробно изложенных в работе [1]. Все они имеют в настоящее время лишь исторический интерес. В то же время, с позиции хемиосмотической концепции в ряде монографий осуществляется трактовка большого количества данных [7–9].

Цепь переноса электронов расположена во внутренней мембране митохондрий и к настоящему времени подробно изучена. В качестве введения в эту довольно сложную область можно использовать учебник Л. Страйера [10], а также монографию [9]. По современным представлениям [11], система окислительного фосфорилирования состоит их пяти главных мембранных комплексов: НАДН-убихинон оксидоредуктазы (комплекс I), сукцинат-убихинон оксидоредуктазы (комплекс II), убихинол-цитохром

с оксидоредуктазы (комплекс цитохром bc_1 или комплекс III), цитохром c–O_2-оксидоредуктазы (комплекс IV) и F1F0-АТФ синтазы (комплекс V). К числу наиболее изученных комплексов, относятся упоминавшиеся в третьей главе комплексы III и IV [12, 13], а также структура F_1F_0-АТФ синтазы (комплекса V) [14, 15]. Относительное расположение отдельных белков в комплексах и их взаимодействие между собой связано с величиной их окислительно-восстановительного потенциала, которая направлена в сторону снижения (от субстратов к кислороду). Имеются данные [11], что, по крайней мере, три из них (I и III–V) могут взаимодействовать между собой и формировать довольно неустойчивый суперкомплекс, структура которого пока не установлена. Мы рассмотрим работы, посвященные некоторым частям электронтранспортной цепи, в изучении структуры которых наметился существенный прогресс.

4.1.1.2. ***Сукцинат-убихинон оксидоредуктаза (комплекс II).*** Этот комплекс обеспечивает перенос электрона от донора, сукцината (янтарной кислоты) к терминальному акцептору — убихинону. Структура этого комплекса в бактериях (E. coli) недавно изучена с неплохим разрешением (2,6 Å) [16]. Было найдено, что редокс центры сукцинат-убихинон оксидоредуктазы (СУО) расположены таким образом, чтобы препятствовать образованию «реактивного кислорода» на флавинадениндинуклеотиде, структура которого отчетливо видна (см. CD). Это позволило объяснить, почему СУО более ярко выражена при аэробном окислении, чем близко родственный фермент фумаратредуктаза, который производит более высокий уровень «реактивного кислорода». Однако каких-либо существенных выводов для цепи переноса электронов авторы из полученных данных не делают. Структура фумаратредуктазы из микроорганизма Wolinella succinogenes, была изучена недавно другой группой исследователей с разрешением 2,2 Å [17]. Что касается митохондриального комплекса II, то пока подробных данных по его структуре не получено.

4.1.1.3. ***Убихинол-цитохром с оксидоредуктаза (комплекс III).*** Считается, что этот комплекс является одним из наиболее важных на пути переноса электронов, как в процессах фотосинтеза (у растений), так и окисления (у животных). В растениях центральным трансмембранным белком кислородного фотосинтеза является цитохром b_6f, а в животных его дыхательным аналогом является цитохром bc_1. Оба они выполняют сходную роль в транспорте протонов и электронов. Комплекс bc_1 представляет собой димер, каждая субъединица которого содержит 11 отдельных белков [12, 18]. Наиболее изученными среди них являются гемсодержащие белки цитохромы b и c_1, а также железо-серный белок Риске. В структуре комплекса присутствуют отдельные молекулы фосфолипидов, а также убихинон — жирорастворимый хинон. Недавно изучена структура растительного комплекса b_6f [19]. В работе [20] проводится сравнительный анализ структур этих двух комплексов.

Состав субъединиц и хромофоров в комплексах цитохромов b_6f и bc_1 в общих чертах является сходным (рис. 4.1). В каждом цикле в восстановленном комплексе жирорастворимый хиноновый переносчик переносит один электрон к Fe_2S_2 центру субъединицы железо-серного белка Риске (ЖСБ), один электрон к «гему b_p» в субъединице цитохрома b_6 (или b) и два протона в водной фазе на электроположительной (p) стороне мембраны. В высокопотенциальной ox/red ветви разветвленного пути электронного транспорта ЖСБ восстанавливают субъединицу мембраносвязанного цитохрома типа с на границе мембраны, которая, в свою очередь, восстанавливает

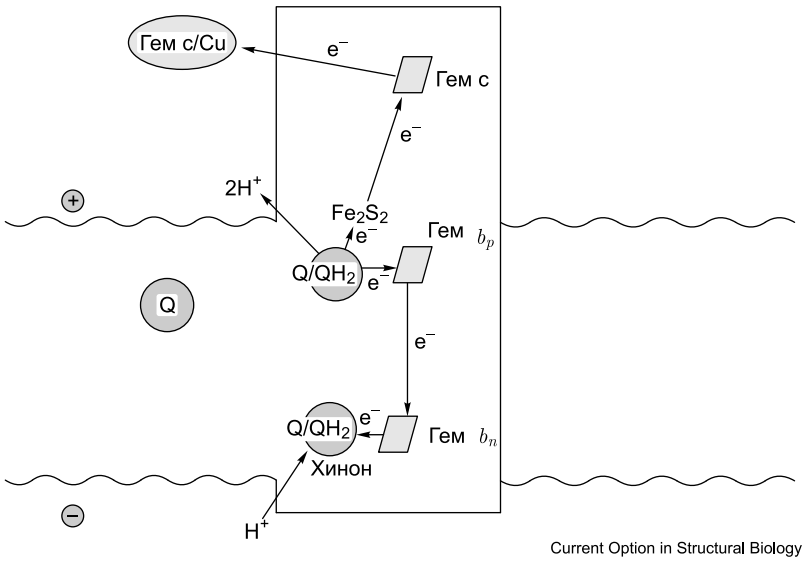


Рис. 4.1. Схема переноса электрона и протона в мономерной единице комплекса «цитохром bc_1» (по [20]). Q/QH_2 — ox/red формы хинона-пластохинона в цитохроме b_6f и убихинона в комплексе bc_1. Растворимым белковым переносчиком в комплексе b_6f являются пластоцианин или цитохром c_6, а в комплексе bc_1 — цитохром c. Волнистые линии — границы мембранного бислоя. Красные стрелки указывают путь высокоэнергетического электрона, зеленые — низкоэнергетического

растворимый гем или медь содержащий белок-переносчик. В низкопотенциальном пути переноса электрона, который проходит через комплекс, гем b_p восстанавливает «heme b_n», который, в свою очередь, восстанавливает хиноновый переносчик (Рис. 4.1.). Восстановление хинона сопровождается захватом протонов из водной фазы на электронегативной (n) стороне мембраны. Этот внутренний электронно-транспортный цикл между гемами и сопряженным восстановлением хинона, известный как «Q-цикл», является наиболее интересным аспектом в комплексах циторомов b_6f и bc_1 [21, 22]. Механизм Q-цикла может объяснить стехиометрию двух протонов, переносимых на p-сторону водной фазы для каждого электрона, переходящего на p-сторону белкового переносчика, в результате чего имеет место более высокая эффективность передачи электрохимической энергии. Конкретные детали механизма переноса зарядов на p- и n-сторонах остаются противоречивыми.

На рис. 4.2 показан общий вид и взаиморасположение отдельных белков в комплексах b_6f [19] и bc_1[12, 20]. Видно, что оба комплекса, несмотря на некоторые различия, имеют определенное сходство, особенно в области, расположенной в пределах мембранного бислоя. Из семи простетических групп, имеющитхся в комплексе b_6f (четыре гема, один Fe_2S_2 кластер, один хлорофилл a и один β-каротин), три (один гем, хлорофилл a и один β-каротин) в комплексе bc_1 отсутствуют. В то ж время, гем b, гем c и группы Fe_2S_2, участвующие в переносе электронов, расположены в комплексах b_6f и bc_1 сходным образом и примерно в тех же местах.

В связи с полученными данными, возникает вопрос о путях дальнего переноса зарядов (25–30 А) между местом восстановления и окисления ЖСБ кластеров.

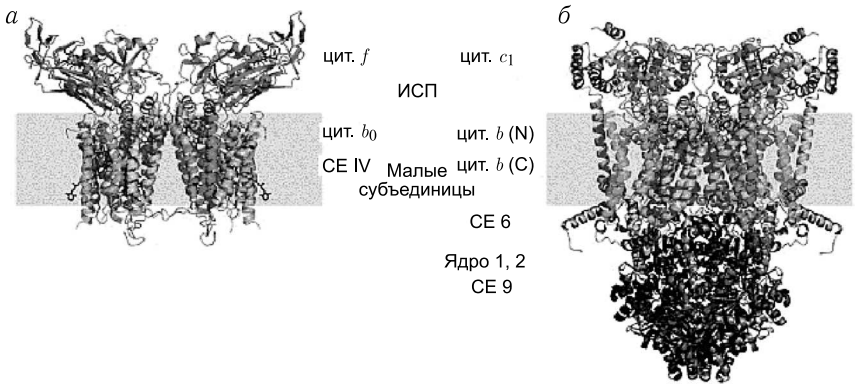


Рис. 4.2. Состав и расположение субъединиц в комплексе b_6f цианобактерий (слева) и бычьего комплекса циторхрома bc_1 (справа) [по 20]

Восстановление Fe_2S_2 хиноном имеет место на Q_p участке в цитохроме b, а окисление мембранно-связанного цитохрома c имеет место на р-стороне водной фазы (рис. 4.2). По крайне мере, в отношении цитохрома bc_1 эта проблема решается за счет челночного перемещения ЖСБ между участками окисления и восстановления, что подтверждается структурными исследованиями [22], однако подробный механизм этого перемещения пока мало исследован. Аналогичный механизм предполагают и для цитохрома b_6f [19].

4.1.1.4. ***Цитохром с-O_2-оксидоредуктаза (комплекс IV).*** Цитохром с оксидаза (ЦсО) катализирует восстановление молекулярного кислорода до воды. В этом процессе используются четыре электрона, четыре протона и одна молекула кислорода (O_2). Реакция сопряжена с перекачкой четырех дополнительных протонов через мембрану. В соответствии с принятой в настоящее время концепцией, перекачка всех четырех протонов происходит после связывания кислорода с восстановленным ферментом и сопряжена с последними двумя этапами переноса электрона [23]. В результате возникает электрохимический потенциал (протонодвижущая сила, ПДС), который обеспечивает синтез молекул АТФ. Одна из главных проблем в области изучения ЦсО — получение детальных сведений о процессах окисления-восстановления, сопряженного с переносом протонов. В настоящее время исследована молекулярная структура кристаллов ЦсО, как микроорганизмах [24], так и митохондрий печени млекопитающих [25]. Структура их различна. В частности, ЦсО митохондрий представляет собой комплексный димер, в каждую субъединицу которого входит, по меньшей мере, 13 отдельных полипептидных цепей. Наиболее важными компонентами являются цитохромы а и a_3, структура которых содержит гемные группировки. В состав субъединиц входят также атомы Cu^{++}, играющие важную роль в переносе электрона. На активность ЦсО влияют мембранные фосфолипиды, которые обнаружены в связанном с ней состоянии [26]. Имеется ряд недавних обзоров, анализирующих последние данные и возможные механизмы работы этого комплекса [26–29].

На рис. 4.3, *а*, синие стрелки показывают, как химическая реакция восстановления O_2 до воды ориентирована по отношению к положительно заряженной Р-стороне и отрицательно заряженной N-стороне мембраны.

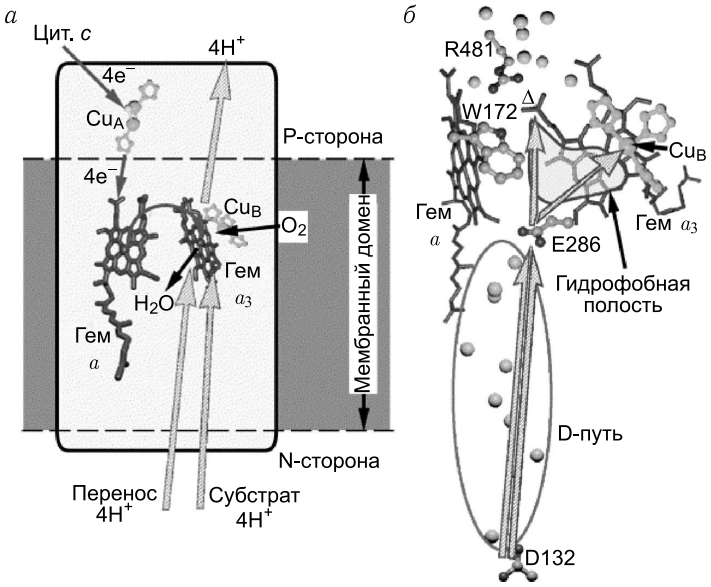


Рис. 4.3. Механизм работы цитохром с-оксидазы (по [29]): *а* — схема расположения компонентов фермента в мембране (перпендикулярный разрез); *б* — расположение ключевых компонентов цитохром с-оксидазы параллельно плоскости мембране

Красные стрелки показывают перенос протонов (перекачку) сопряженную с химией этого процесса. В то же время, рис. 4.3, *б* иллюстрирует как осуществляется перенос протонов по D-пути [29]. Видно, что он проходит с N-стороны мембраны через Glu 286 либо путем перекачки через мембрану (красные стрелки), либо путем захвата с образованием воды на стороне гема a_3–Cu_B. (синие стрелки). Предполагается, что центральную роль в этом пути играет Δ-пропионат гема a_3 (Δ), который может передавать накачиваемые протоны в гидрофильный домен над гемом. В литературе предложен ряд гипотетических механизмов перекачки протонов, сопряженных с восстановлением кислорода, центром внимания в которых является боковая цепь глютаминовой кислоты Glu 286 [27–29], а также низко-спиновый гем цитохром с-оксидазы [30].

4.1.1.5. *F_1F_0-АТФ синтаза (комплекс V).* Комплексный фермент F_1F_0-АТФ синтаза осуществляет синтез молекул АТФ из АДФ и $P_н$, путем использования энергии, выделяющейся в ходе восстановления молекул кислорода до воды (у животных) или фотолиза воды до молекул кислорода (в растениях). Считается, что при этом используется ПДС, возникающая в ходе этих двух процессов. Комплекс V, выделенный из митохондрий животных (частицы Грина) и из мембран микроорганизмов, состоит из двух структурных доменов (рис. 4.4): водорастворимого фактора F_1 (фактор 1) и фактора F_0 (олигомицин-чувствительный фактор), встроенного в мембрану [30]. Фермент, выделенный из хлоропластов имеет сходную структуру, за исключением числа субъединиц *c* в факторе F_0[15]. Фактор F_0 содержит 10 (митохондриальный) или 9–12 (в микроорганизмах) субъединиц *c* (недавно была расшифрована структура субъединицы *c* из дрожжей [31]), а также ряд других компонентов. Структура фактора F_1, сравнительно недавно изученная с разрешением 2,2 Å [14] состоит из

5 субъединиц, со стехиометрией $\alpha_3\beta_3\gamma_1\delta_1\varepsilon_1$. Как видно на рис. 4.4, субъединицы γ, δ и ε образуют центральный «стебель», через который $(\alpha\beta)_3$ комплекс присоединяется к домену F_0. Комплекс $(\alpha\beta)_3$ и F_0, связанные через периферическую часть стебля, иногда называют «статором» [32]. В F_1 домене три α субъединицы и три β субъединицы расположены поочередно вокруг центрального α-спирального стержня γ субъединицы.

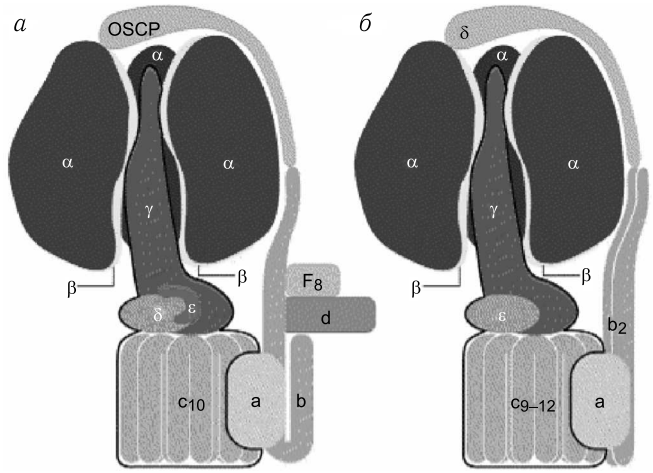


Рис. 4.4. Структура АТФ-синтазы из митохондрий животных (*а*) и мембран микроорганизмов (*б*) (по рисунку из работы [30])

Модели механизма работы F_1F_0-АТФ синтазы, активно изучавшийся в течение более 25 лет Паулем Д. Бойером [15], в процессе исследования претерпели существенную эволюцию. Ее анализ, как мы полагаем, представляет определенный интерес. С начала 70-х годов в его работах господствовала идея поочередного (флип-флоп) функционирования двух активных центров при синтезе АТФ из АДФ и $P_н$, основанная на данных по обмену ^{18}O и ^{32}P неорганического фосфата с немеченной АТФ в присутствии АТФ-азы [33]. В частности, было обнаружено, что присутствие АДФ и $P_н$ в одном активном центре ускоряет процесс синтеза АТФ в другом активном центре. После обнаружения трех активных центров она трансформировалась в 3-центровую модель связывания [34]. Дальнейшее развитие исследований, в первую очередь электронной микроскопии, выявило наличие в этом ферменте шести субъединиц — трех α и трех β, расположенных поочередно в виде цикла вокруг γ субъединицы, представленной в виде одной копии (все это позднее было подтверждено методом РСА). Эти сведения вместе с данными по ^{18}O-обмену были положены в основу модели ротационного катализа (рис. 4.5) [35], в которой вращение внутреннего ядра рассматривалось как основной источник изменений связывающей способности каталитических центров. Модель, показанная на рис. 4.5, предполагает, что асимметрия внутреннего ядра связана с присутствием трех малых субъединиц — γ, δ, ε (то, что сейчас приписывают γ субъединице). Хотя эта модель и не была лишена некоторых противоречий, к началу 90-х годов именно она казалась П. Бойеру наиболее вероятной [35]. Начиная с 1994 года к работе с АТФ синтазой подключилась группа Волькера, которая смогла исследовать структуру F_1-субчастицы методом

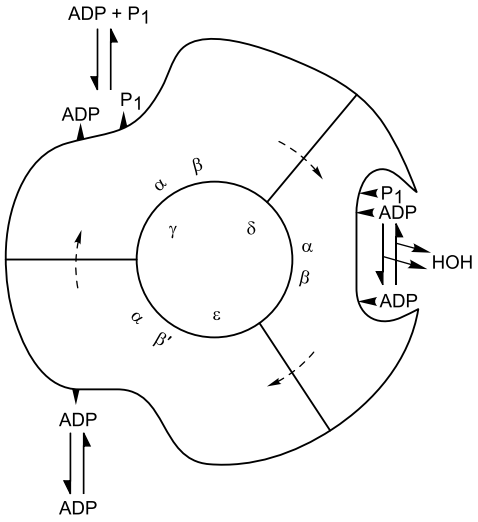


Рис. 4.5. Модель ротационного катализа 1981 года [35]

РСА [36, 37]. К этому времени косвенные данные в пользу ротационного механизма появились в работах [38, 39], а еще чуть позже процесс вращения γ субъединицы в комплексе $(\alpha\beta)_3\gamma$ наблюдали напрямую методом электронной микроскопии [40, 41]. При этом γ субъединица делает вращение на 120° за счет использования одной молекулы АТФ и ожидает в этом положении следующей молекулы АТФ.

Поскольку в процессе распада молекулы АТФ выделяется один электрон, то можно считать, что данный объект является примером конформационных изменений (вращение γ субъединицы), вызываемых одним единственным электроном. Аналогичный гидролиз молекул АТФ наблюдается при работе жгутиков и в мышечном сокращении.

Если процесс вращения γ субъединицы в настоящее время, практически, не вызывает сомнений, то вопрос о том, как энергия окисления используется для образования молекул АТФ по-прежнему остается предметом дискуссий. Предполагается, что во время синтеза вращение генерируется в F_0-домене, подпитываемом энергией ПДС. Гипотетические механизмы этого процесса рассматриваются, например, в работе [42], и основаны на сходстве АТФ синтазы с мотором, осуществляющем вращение бактериальных жгутиков. Обсуждение модели проводится в работе [43]. С другой стороны, во время гидролиза АТФ в комплексе F_1F_0, или только в F_1, энергия, освобождающаяся при гидролизе, осуществляет вращение в противоположном направлении и обращение переноса протона.

4.1.1.6. ***Обсуждение результатов, полученных биоэнергетическим направлением.*** Как мы показали выше, исследование отдельных комплексов, участвующих в процессе переноса электронов, достигло уровня, позволяющего детально рассматривать их молекулярную структуру. Вместе с тем, нельзя не отметить, что этот прогресс лишь незначительно изменил стереотип мышления самих исследователей, по-прежнему использующих, вместо конкретных молекулярных структур, упрощенные схемы (см. рис. 4.1, 4.3, 4.5). Можно также отметить, что хотя имеется, как будто, понимание, что процесс переноса электрона сопряжен (coupled)

с переносом протонов, со времени формулировки хемиосмотической концепции мало что изменилось: оба процесса рассматриваются независимо и пути для них также предполагаются различные. Несмотря на большой объем структурных данных, КПД их использования для понимания сущности процессов переноса зарядов в изученных структурах пока невелик.

Необходимо отметить, что в хемиосмотической концепции имелся с самого начала ряд неясных моментов, связанных с физическими и молекулярными механизмами переноса зарядов. Как правило, при построении схем, связанных с переносом электронов, пути электронов изображались на «пустой» структуре белков и мембран, не учитывалась симметричная организация белков [9]. Пути перемещения протонов, по Митчеллу, отличались от путей электронов, причем перемещение протонов происходило вдоль в мембраны, по водной среде при участии поверхностных белков [3]. Все эти представления полностью унаследованы современными исследователями в области биоэнергетики. Не случайно, по-видимому, проблемы перекачки протонов по-прежнему остаются предметом дискуссий [27–30, 44]. Такой же острой проблемой, несмотря на большие достижения в структурном исследовании компонентов электронно-транспортной цепи, остается вопрос о том, как энергия окисления или фотосинтеза используется для образования молекул АТФ [42, 43].

Отсутствие прямой связи хемиосмотической концепции с физическими механизмами переноса зарядов в биоструктурах, а также с конкретной молекулярной организацией структур (белков, биомембран, и т. д.), на наш взгляд, является существенным недостатком данной концепции. Представление о мембранном потенциале является бесструктурным и лишь констатирует факт существования физических процессов, происходящих на молекулярном уровне, сущность которых в данной концепции так и остается не вскрытой. Следует также отметить, что термин «протонодвижущая сила», несмотря широкое его использование, очень сильно напоминает понятие «жизненной силы», которое применялось в конце 19-го века, в период господства витализма.

4.1.2. Изучение механизмов дальнего переноса электронов в белках. Как мы видели в предыдущем разделе, процесс переноса электронов между белками должен происходить на расстояния 20–50 Å и более. Факты такого переноса были установлены экспериментально. Для объяснения механизмов дальнего переноса зарядов был предложен ряд физических моделей. Обычно, чтобы произошел перенос заряда, например электрона, ему необходимо преодолеть некоторый потенциальный барьер. При этом на каждом этапе преодоления барьера будет теряться часть энергии и процесс будет постепенно затухать. В то же время, существует теоретическая модель, в рамках которой электрон не преодолевает потенциальный барьер, а как бы «просачивается» через него, туннелирует [45]. Такой механизм называют туннельным (подбарьерным). Обычно этот механизм реализуется при низких температурах. Механизм туннелирования электрона имеет то преимущество, что он может происходить на дальние расстояния без существенных потерь энергии. В настоящее время туннельный механизм переноса зарядов является широко распространенной моделью, используемой для объяснения природы дальнего переноса электронов.

4.1.2.1. ***Туннелирование как один из механизмов дальнего переноса электрона.*** Появление этого направления исследований обычно связывают с ранними работами Де Во и Чанса по измерению скорости реакции окисления цитохромов

в реакционных центрах бактерий Chromatium при температуре 4,5 K [46, 47]. В этих опытах наблюдали, что время полужизни оптического возбуждения при переносе от бактериохлорофилла к цитохрому составляет при этой температуре 2,3 мсек и в пределах от 4,5 до 100 K остается практически постоянным. В пределах от 100 до 300 K оно уменьшается с 2,3 мсек до 2 мксек, а энергия активации составляет, соответственно, $3{,}5 \cdot 10^{-3}$ и 0,14 эВ. Сами авторы дали следующее объяснение полученным фактам. При температурах от 300 до 4,5 °K действует механизм кваново-механического туннелирования между соседними носителями цепи переноса электронов. При разных температурах он действует с различных уровней, находящихся в термическом равновесии.

В дальнейшем более корректно с теоретической точки зрения эти результаты были интерпретированы Хопфилдом на основе кинетической модели термально активируемого электронного туннелирования [48], а также Джортнером, в терминах неадиабатического многофононного процесса [49]. В рамках модели [49] были получены выражения, включающие как эффекты низкочастотной фононной моды, так и высокочастотной вибрационной моды. Для случая с Chromatium преобладает ядерный вклад в электронный транспорт путем сопряжения с высокочастотной молекулярной модой и получены уравнения, адекватно описывающие процессы в [46, 47] на всем протяжении температур. Таким образом, в рамках модели [49], окисление цитохромов является примером механизма, происходящего при низких температурах как ядерное туннелирование, который при высоких температурах переходит к активационному процессу.

4.1.2.2. ***Методы изучения дальнего переноса электронов в белках.*** Широкое внедрение метода РСА в исследование белков создало предпосылки к направленному конструированию модифицированных белков для изучения дальнего переноса зарядов. При этом было необходимо на основе белков создать такие модельные соединения, которые бы содержали пространственно удаленные центры с донорами и акцепторами зарядов. Для этой цели в 1982 году были получены модифицированные пентаамонийрутением производные циотохрома c [50]. Их особенностью было то, что они не вносили существенных возмущений в структуру модельных белков. Образовавшийся стабильный комплекс $Ru(NH_3)_5(His\ 33)^{n+}$ и атом железа (Fe^{3+}), расположенный в геме феррицитохрома c на расстоянии в 15 Å от комплекса, образовали редокс пару, на которой можно было изучать дальний перенос зарядов. Процесс переноса зарядов исследовали с помощью метода флэш фотолиза (импульсного фотолиза), получившего в то время широкое распространение в фотохимии [51]. В работе [52] на раствор, содержащий модифицированный белок и восстанавливающий агент ($Ru(bpy)_3^{2+}$, bpy = 2,2′-bipyridine), действовали вспышкой лазера (порядка 8 нс) и следили за изменением оптической плотности при определенной длине волны (550 нм). На основе анализа кинетических параметров системы был сделан вывод, что хотя центр с Ru расположен в 15 Å от гема, скорость внутримолекулярного переноса $P\text{-}Fe^{III}\text{–}Ru^{II} \rightarrow P\text{-}Fe^{II}\text{–}Ru^{III}$ составляет порядка $25\ с^{-1}$ и не зависит от температуры. Именно с работ [50, 52] возникло направление по исследованию дальнего переноса электронов в биоструктурах. Близкий к предыдущему метод импульсного радиолиза был использован для изучения процессов переноса электронов в цитохромоксидазе [53], причем источником свободных радикалов был 1-метилникотинамид.

В настоящее время изучением этих процессов, с использованием предложенных методов занимаются несколько групп исследователей на разнообразных объектах. Анализ современных данных, полученных на модифицированных производными Ru белках, проведен в работе [54]. Судя по данному обзору, это направление считается ведущим в плане исследования физических механизмов переноса электронов в биоструктурах. Для удобства изложения мы подразделили эти объекты на группы, в зависимости от типа акцепторных ионов (Fe, Cu, и т. д.).

4.1.2.3. ***Модельные белки, используемые для исследования дальнего переноса электронов.*** **Белки, содержащие железо в качестве акцептора электронов**. Вскоре после получения результатов на цитохроме с было получено и изучено Ru-модифицированное производное миоглобина кашалота [55], также содержащее атом Fe^{3+} в структуре гема. В дальнейшем, аналогичным методом дальний перенос электронов был показан и на других гем-содержащих белках: цитохроме c_{551} [56] и цитохроме b_5 [57], а также на гемоглобине, у которого атом Fe был замещен на атом Zn [58]. Однако такой перенос был продемонстрирован и на негемовых Fe-содержащих протеинах, например, высокопотенциальных железо-серных белках, участвующих в цепи переноса электронов [59]. В последние годы проявляется интерес к межмолекулярному переносу электронов. Методом флэш фотолиза дальний перенос был показан, например, для комплекса Ru-модифицированного производного цитохрома c и цитохрома c_1 [60]. Во всех случаях модификации подвергался какой-либо из доступных внешних гистидинов.

Белки, содержащие в качестве акцептора медь. В последующие годы были предприняты усилия получить и исследовать $Ru(NH_3)_5$(His 83) азурин, белок, содержащий в своем составе Cu^{2+} и участвующий в переносе электронов в дыхательной цепи бактерий [61]. В дальнейшем часто используемыми моделями для изучения дальнего переноса электронов стали такие медь-содержащие белки как азурин, пластоцианины и их аналоги [62, 63], а также оксидазы (в частности, цитохромоксидаза) [64]. В качестве нового лиганда для изучения дальнего переноса электронов в азурине недавно были предложены производные рения (Re) [65]. Параллельно, для изучения переноса электронов используется и метод импульсного радиолиза [66–68].

4.1.2.4. ***Предполагаемые пути переноса электронов в белках.*** Предварительно отметим, что для целей описания процесса переноса электронов в работах этого направления часто используются такие понятия как движущая сила ($-\Delta G^\circ$), активационная свободная энергия ($\Delta G^+{}_+$) и энергия реорганизации (λ), с которыми можно ознакомится, например, в работах [54, 69]. Эти понятия были развиты для описания аналогичных процессов в растворах, и было естественным распространить их на исследования модельных белков, также проводимых в растворах.

Однако следует отметить, что особенностью подхода с использованием модифицированных белков является то, что он является неструктурным. Несмотря на то, что авторы основывают свои исследования на известных структурах исследуемых модельных белков, исходя из получаемых данных (временах переноса электрона) можно лишь предполагать возможные пути для переноса электронов. Так, для путей от гистидинов к атому Fe в цитохроме с было предложено несколько путей, в том числе путь из 16-ти связей от His-33, который включает водородную связь между His 18 N Pro 30 C=O и путь из 17 связей, с 14 ковалентными связями и тремя водородными связями [71]. На основании сопоставления констант сопряжения-распада

α-спиральных и β-структурных белков авторы делают вывод о существовании двух типов сопрягающих зон — α-зон и β-зон [69]. Однако они не выделяют каких-либо особых путей для различных белков и допускают возможность туннелирования как по ковалентным связям, так и с участием водородных связей.

Парадоксально, но сторонники этого подхода обнаруживают существенное непонимание того, что функции того или иного белка должны обеспечиваться определенными структурными элементами, в том числе, осуществляющими перенос заряда. С позиции биологических взглядов этот подход критикуется в работе [72]. Что касается возможности использования развиваемых подходов и представлений для создания устройств наноэлектроники, то в случае белков он является совершенно непродуктивным. На основе общего механизма туннелирования «шубу не сошьешь» и надмолекулярную структуру не построишь. Тем не менее, именно данный механизм оказался в центре внимания исследований, посвященных возможной перспективе создания молекулярных компьютеров, но не на основе белков, а на основе ДНК, которая является линейной, и могла бы стать основой для молекулярных проводов [73].

4.1.3. Исследование механизмов дальнего переноса зарядов в ДНК. Структура ДНК (см. гл. 2) предоставляет несколько возможностей для переноса зарядов. Во первых, такой перенос возможен в парах A–T, G–C при участии водородных связей. Во вторых, миграция заряда возможна в двойной спирали по азотистым основаниям, находящимся в стэкинг-взаимодействиях (взаимодействия оснований, находящихся друг над другом). Наконец, в третьих, возможен путь переноса зарядов по сахаро-фосфатному остову. Все эти возможности, так или иначе, рассматривались с использованием как теоретических, так и экспериментальных подходов. Однако переносу энергии в парах азотистых оснований, изучавшемуся в 60-е годы [74] придают локальное значение, а перенос зарядов по сахаро-фосфатному остову кажется маловероятным из-за большого числа одинарных связей. В настоящее время активно изучается вопрос о переносе зарядов по стопке оснований ДНК.

4.1.3.1. ***Экспериментальные результаты.*** Первые сообщения о дальнем переносе электронов в ДНК появились, по видимому, в середине 80-х годов. В частности, с использованием метода тушения фотоиндуцированной флуоресценции этидиума (циклического соединения, встраивающегося в структуру ДНК и используемого для ее обнаружения) метилвилогеном, впервые было показано, что присутствие ДНК в растворе ускоряло скорость электронного транспорта в 500 тыс. раз [75]. Другая группа авторов обнаружила, что тушение флуоресценции комплекса рутений-фенантролин (упоминавшийся выше донор электронов) комплексом родия с трис-фенантролином (акцептор электронов) усиливалось на два порядка при добавлении ДНК [76]. Структура этих комплексов и возможное их расположение при встраивании в ДНК представлены на рис. 4.6.

На рисунке видно, что встроенные (инеркалированные) в ДНК комплексы могут взаимодействовать только через стопку оснований. В последующие годы были синтезирован еще ряд комплексов, с помощью которых был подтвержден этот перенос электрона по стопкам оснований ДНК [77]. Возможность дальнего переноса электрона в ДНК была продемонстрирована с использованием и других методов [78, 79].

Помимо фотофизических методов, в последнее время проводятся и электрофизические исследования ориентированных пленок ДНК [73, 80, 81]. При этом замена неорганических ионов на соли четвертичного аммония не влияла на полученные

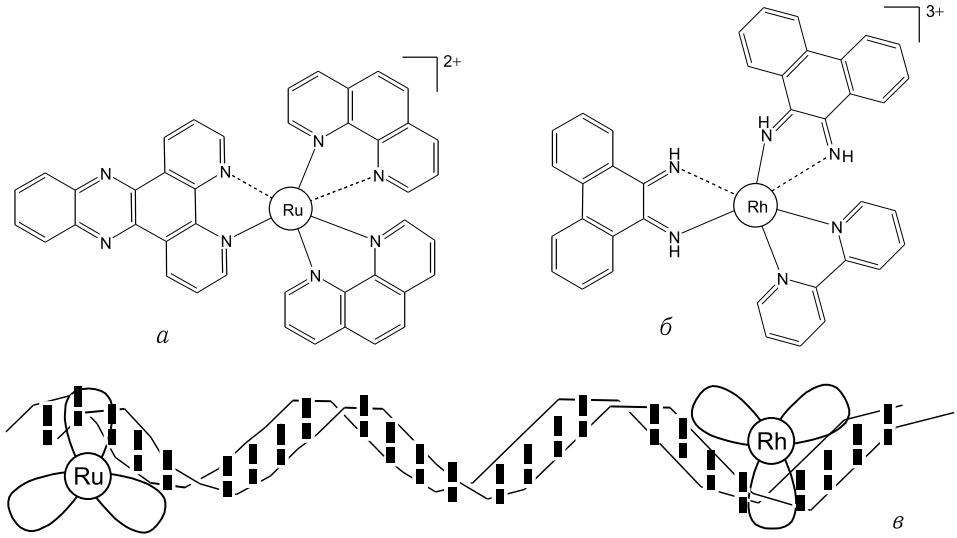


Рис. 4.6. Структура комплекса рутения с фенантролином (*а*), родия с трис-фенантролином (*б*) и возможное их расположение при встраивании в молекулу ДНК (*в*) (по [77])

результаты [80]. В этих работах показано, что ДНК ведет себя как полупроводник. В недавней работе [81] были получены пленки ДНК, содержащие разрывы в сахарофосфатном остове, которые практически не влияли на свойства пленок. Авторы делают вывод, что именно стопки азотистых оснований, а не сахаро-фосфатный остов вносят основной вклад в перенос зарядов в ДНК.

4.1.3.2. ***Биологически значимый дальний перенос электронов и дырок в ДНК.*** В процессе изучения дальнего переноса зарядов по ДНК всегда возникал вопрос: а имеет ли такой перенос какое-либо биологически значение? В последние годы для ряда эффектов, наблюдаемых на ДНК, по-видимому, найдены приемлемые объяснения, где этот перенос может происходить.

Одним из таких процессов является окисление азотистого основания гуанина. Процесс окисления гуанинов (G) в ДНК может происходить в условиях окислительного стресса [82], так что дальний перенос электронов в ДНК, происходящий при этом, может иметь важные биологические последствия [83]. С помощью металлокомплекса, содержащего родий, было показано, что возникающий в результате повреждения $G \rightarrow G^+$ положительный заряд (дырка — hole) может мигрировать на значительное расстояние (до 365 пар оснований) к Rh-комплексу, связанному с ДНК, что приводит к потере дырок и восстановлению гуанина: $G^+ \rightarrow G$ [84].

Другой биологически значимый процесс, в котором может использоваться дальний перенос электронов в ДНК — это восстановление димеров тимина (T–T). Образование сшивок между двумя тиминами может происходить в ДНК под действием ультафиолетового облучения и может быть причиной рака кожи [85]. С использованием Rh-комплекса, возбуждаемого светом с длиной волны 400 нм было показано, что имеет место миграция дырок от этого комплекса на расстояния порядка 19–26 Å, в результате чего димеры восстанавливаются до нормальных тиминов [86]. Подробный анализ последних данных, полученных в этой области, приводится в обзоре [87].

4.1.3.3. ***Анализ современных подходов к исследованию дальнего переноса электронов в белках и ДНК.*** Несмотря на то, что изложенные подходы к исследованию дальнего переноса электронов получили широкое распространение и признание, нельзя не сказать о том, что получаемые результаты встречают определенные возражения у некоторых коллег. В частности, имеются сомнения относительно дальнего переноса электронов в ДНК, изложенные в работе [72]. Существенному сомнению подвергаются данные по дальнему переносу дырок в ДНК [84, 88]. Так, в работе [89] предлагается принципиально иное объяснение наблюдаемым эффектам и утверждается, что миграция дырок вообще не имеет места. Возможно, что в процессе дальнейших исследований эти сомнения будут сняты.

Однако, несмотря на ряд упомянутых возможных биологических применений, найденных в последние годы для дальнего переноса электронов по ДНК, хотелось бы высказать возможные сомнения в биологической значимости этих процессов. Упомянутые применения имеют достаточно ограниченное значение. В то же время перенос зарядов происходит в клетках постоянно.

Перейдем к обсуждению всего подхода. Нам кажется сомнительным, чтобы такой неспецифический механизм как туннелирование (по ковалентным связям в белках и по стопкам оснований в ДНК) мог использоваться в биоструктурах для переработки информации. Дело в том, что основными источниками зарядов в биоструктурах являются молекулы АТФ, ГТФ и других трифосфатов. Именно распад нуклеотидтрифосфатов (НТФ) на неорганический фосфат ($Р_н$) и нуклеотиддифосфат (НДФ) приводит к появлению электрона, осуществляющего основные механохимические процессы в биоструктурах (см. раздел 4.1.1.5).

Что мы имеем в случае производных рутения, рения и родия. Все эти элементы в живой природе не встречаются. Причина этого может состоять в том, что энергия электрона, который отдают или поглощают эти элементы, по-видимому, не соответствует той энергии, которая присуща электрону, выделяющемуся при распаде НТФ. Моделирование процессов переноса зарядов с использованием этих ионов равносильно тому, как если бы мы пытались показать работу микросхемы, используя произвольно выбранные величины тока и напряжения. Возможно, что при этом мы бы и обнаружили, что имеет место прохождение заряда (туннелирование!), но связано оно не с функционированием микросхемы, а с ее пробоем. Примерно так мы представляем то, что наблюдают авторы работ, упомянутых в разделах 4.1.2 и 4.1.3. Не случайно, по видимому, имеются определенные трудности в создании модели ДНК-компьютера с позиции дальнего переноса электрона в ДНК [90]. Как для белков, так и для ДНК туннельный механизм никак не связывается с реальными свойствами основных элементов этих структур — аминокислот и азотистых оснований. Если бы удалось эффекты туннелирования получить с использованием электрона, выделяющегося при распаде распада НТФ, тогда критика с этих позиций была бы лишена оснований. Однако пока эти данные нами в литературе не найдены.

На наш взгляд, развитие «пробирочного» направления при исследовании механизмов переноса электронов, как и в случае с механизмами самоорганизации, также заводит исследователей «не в ту степь». Изучаемые механизмы оказались мало продуктивными для использования в анализе функциональных свойств биоструктур, изучаемых с высокой разрешающей способностью, и скорее запутывают картину, чем ее проясняют.

4.2. Теоретические подходы в биоэнергетике

Как мы упоминали в начале этой главы, разделение подходов на две группы — экспериментальные и теоретические весьма условно. В этом разделе основной упор будет сделан на анализ теоретических подходов, предполагающих существование в биоструктурах специальных структур, осуществляющих перенос зарядов. Где возможно, будут приводиться и экспериментальные данные в поддержку тех или иных взглядов. То, что в данное время возобладали экспериментальные подходы, имеет положительный и отрицательный моменты. Возможность модельного эксперимента имеет то преимущество, что позволяет исследователям получать воспроизводимые результаты. Отрицательный же момент состоит в зависимости эффективности модели от степени воссоздания условий реального объекта (имеется в виду биоструктуры, существующие в условиях клетки). Несоответствие этих условий может привести и часто приводит к тупиковым направлениям. Развитие теоретических подходов позволяет мысленно смоделировать то, что в настоящее время еще не в состоянии сделать эксперимент. В этом смысле они дополняют друг друга, причем теория может стимулировать развитие экспериментальных походов. Учитывая, однако, существующее доминирование экспериментальных подходов, обзор теоретических подходов, по необходимости, будет носить большей частью исторический характер, дополненный, где это возможно, данными современной литературы.

4.2.1. Гипотезы о специфических каналах переноса зарядов в биоструктурах. Идея о существовании в биоструктурах специфических зон или каналов, обеспечивающих перенос энергии или зарядов, возникла еще до второй мировой войны. По-видимому, одними из первых идею о миграции электронов в комплексах хлорофилла по специфическим зонам высказали авторы работы [91]. Эта идея была поддержана известным физиком Р. Иорданом [92]. Однако наиболее четкое выражение она получила у А. Сцент-Дьердьи [93]. В то время только ставился вопрос о рассмотрении биологических структур в качестве твердых тел и о применении к ним подходов, развитых в физике твердого тела, в частности, зонной теории полупроводников. Согласно Сцент-Дьердьи, «многие явления, известные в биологии, можно объяснить с позиции зон проводимости. В частности, предположение об общих энергетических уровнях дает простой ответ на вопрос, как энергия распада АТФ может быть сообщена большому числу молекул, участвующих в мышечном сокращении. Другой вопрос, как белки окисления взаимодействуют друг с другом, станет понятным, если мы предположим, что один фермент связан с другим различными энергетическими уровнями, и электрон двигается не прямо от одного вещества к другому, а внутри соответствующей энергетической зоны. При этом он может переходить на более низкий энергетический уровень, отдавая энергию только там, где она требуется, чтобы совершать работу. Эта выдержке из статьи [93] показывает привлекательность представлений о зонах проводимости для объяснения биологических явлений. Однако, эти представления пока еще не были связаны с какими-либо конкретными элементами биоструктур.

В 1947 году, когда еще шли споры о структуре связей аминокислот в белках и Л. Полингом еще не были предложены основанные на экспериментах модели α-спиральной и β-структурной организации белков, были одновременно опубликованы две работы [94, 95], постулировавшие в белках существование специфических

структур для переноса энергии и протонов. В частности, Виртц [94] предположил, что в белках возможно существование систем пептидных групп (схема 4.2):

$$\rightarrow \text{HN–C=O}\ldots\ \text{HN–C=O}\ldots\ \text{HN–C=O}\ldots\ \text{HN–C=O}\ldots\ \text{HN–C=O}\ldots, \qquad (4.2)$$

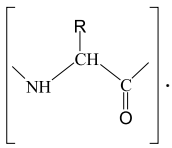
через которые может происходить, при наличии асимметрии водородных связей, одновременный перенос энергии и коллективный сдвиг протонов (схема 4.3):

$$\text{N=C–OH}\ldots\ \text{N=C–OH}\ldots\ \text{N=C–OH}\ldots\ \text{N=C–OH}\ldots\ \text{N=C–OH}\ldots\rightarrow . \qquad (4.3)$$

Этот процесс сопровождается переходом кето-формы пептидной связи в енольную. По мысли автора, повторение этого процесса в том же направлении может быть только после того, как все группы снова перейдут в кето-форму. В этом существенное отличие данного механизма от других механизмов, связанных с переносом электронов и протонов. Автор, однако, не указывает, каким образом происходит возврат данной системы к исходному состоянию.

4.2.2.1. ***Расчеты зон проводимости в системах пептидно-водородных связей.*** Описанный выше механизм в свое время не был принят во внимание. Исследователей больше привлекла идея специфических зон проводимости, по которым мог бы переноситься электрон. В то время еще было довольно мало возможностей для проведения всеобъемлющих квантово-химических расчетов. Тем не менее, рассматривая системы HN–C=O-групп как элементарные ячейки, Эванс и Гергели, вдохновленные идеей энергетических зон проводимости [93], провели расчет этих систем с помощью простого метода кристаллических орбиталей [96]. По данным этих авторов, молекула белка характеризуется тремя энергетическими зонами. Две из них — заполнены, а третья — вакантная. Ширина запрещенных зон между первой и второй, а также второй и третьей проводящими зонами составляла порядка 3 эВ, что довольно много, чтобы рассматривать эти зоны в качестве полупроводящих. Дальнейшее уточнение этих расчетов, проведенное в работе [97], показало, что величина запрещенной зоны в системах пептидно-водородных связей составляет 5 эВ. Эти расчеты свидетельствуют о том, что в чистом виде подобные системы не могут иметь собственной электронной или дырочной проводимости. Детально эти вопросы обсуждаются также в монографии [98].

4.2.2.2. ***Возможности переноса зарядов по основной цепи белка.*** Полипептидная цепь предоставляет еще одну возможность для построения моделей переноса зарядов — по полипептидному остову. В самом деле, наиболее простое предположение для белков состоит в том, что может осуществляться перенос энергии по группам (схема 4.4):



(4.4)

Впервые такое предположение было сформулировано Л. Бриллюэном в работе [99]. Ширина запрещенной зоны между энергетическими зонами достаточно велика — 8–10 эВ. Однако, по мнению Л. Бриллюэна, полипептидная цепь может иметь полупроводниковые свойства благодаря наличию боковых цепей, которые могут действовать как примесные центры. Расчет полупроводниковых свойств в β-структурах

полиглицина показал, что подвижность для электронов и дырок в полипептидной цепи значительно выше, чем в системах водородных связей [100].

Эта модель, получившая название «электронной тропы», была детально рассмотрена в работах [101–102]. С помощью квантово-химических расчетов были проанализированы возможности использования полипептидной цепи для переноса энергии. Показано, что при взаимодействии белков с водой может происходить образование энергодонорных групп (например, $^{-}$O–C=O-групп). Наивысший заселенный уровень этих групп располагается вблизи зон проводимости полипептидной цепи белка. При этом создается возможность переноса электрона от энергодонорной группы через зону проводимости, к пространственно удаленному акцептору. Модель включает также возможность релаксационных процессов. Таким образом, несмотря на высокие значения запрещенной зоны, сближенность энергетических уровней доноров, полипептидной цепи и акцепторов электрона могут обеспечить миграцию зарядов вдоль полипептидной цепи. Эта модель формально совпадает с рассмотренными выше представлениями о путях туннелирования электрона по полипептидному остову, хотя механизмы переноса зарядов, очевидно, являются разными. В настоящее время модель электронной тропы авторами не разрабатывается.

На наш взгляд, рассмотрение боковых цепей аминокислот в качестве энергетических ловушек для электрона, бегущего по полипептидному остову, с биологической точки зрения является крайне неудачным и ставит реальное положение дел с ног на голову. Не боковые цепи, кстати изолированные несколькими σ-связями от основной цепи, служат «ловушками» для полипептидной цепи, а основная цепь поддерживает боковые цепи белка.

4.2.3. Модели переноса зарядов в ДНК. Как мы упоминали выше (раздел 4.1.3), структура ДНК также предоставляет возможность для построения нескольких моделей по переносу зарядов и в частности, по стопке оснований и сахаро-фосфатному остову. В монографии [98] проведен анализ работ по квантово-химическим расчетам полупроводниковых свойств ДНК. Из этих работ следует, что ДНК обладает хотя и незначительной, но не пренебрежимо малой проводимостью, обусловленной делокализацией π-электронов в стопке оснований посредством π-электронного перекрывания. Этот вывод, как мы видели в разделе 4.1.3, ныне подтвержден экспериментально.

Близкая к моделям раздела 4.2.2.2 идея лежит в основе расчетов энергетических зон и электронной делокализации в сахаро-фосфатном остове ДНК [103]. Автор не исключает возможности, что этот остов может явиться не менее эффективным проводником электрона, чем система гетероциклических оснований. Упоминавшаяся в разделе 4.1.3.1 недавняя работа [81], согласно которой сахаро-фосфатный остов не существенно влияет на проводимость пленок ДНК, по видимому, может служить указанием на то, что сахаро-фосфатный остов непригоден для целей переноса электронов в ДНК.

4.2.4. Механизм солитонного переноса энергии. В работах академика А. С. Давыдова [104, 105] была развита концепция солитонного переноса энергии в белках. Сама идея солитонов, т. е. одиночной волны возбуждения (электронов или вибрационного возбуждения) представляла собой попытку предложить возможное теоретическое решение проблемы дальнего переноса энергии. В качестве основы для формирования солитонов рассматривались системы пептидных связей.

Процесс перемещения этих квази-частиц, происходящий со скоростью, превышающей скорость звука, сопровождается локальной деформацией полипептидной цепи. При этом оно происходит без потерь энергии, напоминая явления сверхпроводимости или процесс туннелирования. Квантово-химическими расчетами показана значительная устойчивость солитонов к различным возмущающим воздействиям. Однако ряд свойств солитонов сильно ограничивает возможное их распространение в биоструктурах. Во-первых, солитонная волна может возникать при определенном минимальном числе пептидных групп (три пептидных группы). Во вторых, в отличие от экситонов, возбуждение светом является запрещенным для солитонов, в соответствии с принципом Франка–Кондона, согласно которому оптический перенос не должен сопровождаться сдвигом тяжелых частиц. Иными словами, солитоны не применимы для электронных процессов, идущих при фотосинтеза, т. е. не являются универсальными носителями зарядов. В третьих, модель солитонов хорошо проходит для случая одномерной молекулярной цепи, состоящей из пептидных связей. Как мы рассматривали в третьей главе, в белках встречаются в большом количестве и разветвленные системы водородных связей, включающие также боковые цепи аминокислот. Возможность движения солитона по разветвленным системам автором не рассматривалась. В настоящее время идея использования солитонов для переноса зарядов в биоструктурах, популярная в 70–80-е годы 20-го века, практически никем не разрабатывается.

4.2.5. Модели переноса зарядов, учитывающие эффекты кето-енольной таутомерии и перемещения водородных связей. Идея кето-енольной таутомерии, сформулированная в модели К. Виртца в применении к пептидным связям (раздел 4.2.1) нашла свое дальнейшее развитие в обобщенном виде в работах других авторов. Так, О. М. Полторак в ряде работ [106, 107] развил теорию цепей перераспределения связей (ЦПС), основанную на анализе строения активных центров ряда ферментов. Теория предполагает, что перенос электрона по цепи чередующихся двойных и одинарных связей, включающей также и водородные связи, сопровождается перераспределением этих связей. Одинарные связи переходят в двойные, а двойные — в одинарные. При этом одновременно происходит перемещение атомов водорода (протонов) навстречу электронной плотности. Предполагается обратимость прямого и обратного процесса переноса электронов и протонов, хотя механизмы этого процесса автором не рассматриваются. Однако предложенный формальный аппарат для описания процессов в ЦПС оказался крайне неудачным. И хотя теория ЦПС даже включена в учебники биофизики [108], ее практическое использование остается ограниченным.

Близкие идеи о принципиальной значимости кето-енольных переходов и коллективных перемещений протонов в каталитической активности белков высказаны в работе Д. Е. Мецлера [109]. Для обоснования своих взглядов автор проводит анализ известных в то время структур белков. К сожалению, однако, эти идеи не были выражены в какой-либо законченной формализованной теории. В настоящее время эти взгляды также излагаются в учебнике биохимии автора [110].

К числу сторонников идеи переноса заряда через водородную связь можно отнести также Д. М. Блоу, обнаружившего в структуре химотрипсина систему из нескольких полярных групп (Asp 102, His 57, Ser 195), так называемую «систему передачи заряда» (charge relay system) [111]. К близким идеям о важной роли систем

водородных связей в переносе электронов подходили также группы Диккерсона [112] и Краута [113] на основе изучения структуры цитохромов. В дальнейшем, тем не менее, интерес к этому механизму существенно снизился, возможно, под влиянием работ по дальнему переносу электронов в белках и ДНК. Одной из последних работ, в которых положительно воспринимается идея переноса зарядов через водородную связь, является упоминавшаяся уже статья [72], автор которой в свое время также развивал сходные идеи.

4.2.6. Основные требования к механизму переноса зарядов с точки зрения электроники. Интегральные схемы, как известно, имеют системотехнический набор элементов (модулей), сочетание которых может обеспечить реализацию тех или иных функциональных свойств. Эти элементы определенным образом соединены между собой посредством линий коммутации, образуя стандартные функциональные схемы. Но самое главное, перенос зарядов происходит по этим структурам на основе единого универсального механизма. Правомерно ли сопоставлять интегральные схемы макроуровня и биоструктуры?

Нам представляется, что биоструктуры имеют много общего с интегральными схемами. Так, они содержат определенный ограниченный набор модулей (аминокислот, азотистых оснований и т. д.). Как мы видели в предыдущих двух главах, эти элементы объединены в интегральные структуры с иерахичекой надмолекулярной организацией. Очевидно, что эти элементы должны и функционировать в составе этих структур. Инженерный подход подсказывает, что биоструктуры должны строиться на основе принципа, объединяющего структуры в интегральное целое, в котором реализуется единый механизм переноса зарядов. На наш взгляд, данный принцип должен:

— быть универсальным, применимым ко всем типам надмолекулярных структур;

— использоваться при конструировании надмолекулярных наноструктур;

— учитывать особенности надмолекулярной организации и работы биоструктур, например, субъединичное строение и поочередность функционирования субъединиц;

— допускать включение в единую систему, как проводящих элементов, так и функциональных модулей;

— обеспечивать выделение в составе элементов входов и выходов, и построение на этой основе функциональных модулей.

Проведенный в этой главе анализ разнообразных подходов показал, что ни один из них в полной мере не удовлетворяет данным требованиям. Так, представления о мембранном потенциале не могут быть использованы в качестве универсальных (для анализа работы генов они не применяются). Они не подходят также для объяснения олигомерной организации биоструктур и поочередности их функционирования, для выделения в составе структур проводящих элементов и молекулярных модулей, для выделения в структуре модулей входов и выходов. Механизм туннелирования, хотя и претендует на универсальность, но не работает в отношении остальных аспектов. Например, для его реализации не требуется субъединичного строения надмолекулярных структур. Еще большими недостатками обладает солитонный механизм, который не является универсальным. Из всех подходов наиболее полно отвечает упомянутым выше критериям теория ЦПС, однако неудачный формальный аппарат сильно ограничил возможности ее дальнейшего развития. Таким образом, на основе анализа изложенных в данной главе подходов можно сделать вывод, что

существующие представления о механизмах переноса зарядов в надмолекулярных биоструктурах пока не могут быть использованы для создания бионических наноструктур.

В рамках концепции, изложенной в этой книге, мы исходили из предположения, что способность биомолекул участвовать в построении биоструктур и в переносе зарядов в этих структурах должна быть заложена в свойствах самих биомолекул. Анализу этих свойств и дальнейшему развитию возникших на их основе принципов посвящены последующие разделы нашей книги.

Литература к главе 4

1. *Карасев В.А.*, *Стефанов В.Е.*, *Курганов Б.И.* Надмолекулярные биоструктуры: организация, функционирование, происхождение // В кн.: Итоги науки и техники. Сер. Биолог. химия. Т. 31. — М.: ВИНИТИ, 1989. — 199 с.
2. *Mitchell P.* Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation // Biol. Rev. Camb. Philos. Soc. 1966. V. 41. P. 445–502.
3. *Mitchell P.* Compartmentation and communication in living systems. Ligand conduction: a general catalytic principle in chemical, osmotic and chemiosmotic reaction systems // Eur. J. Biochem. 1979. V. 95. P. 1–20.
4. *Mitchell P.* Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism // Nature. 1961. V. 191. P. 144–148.
5. *Williams R.J.P.* The multifarious coupling of energy transduction // Biochim. Biophys. Acta. 1978. V. 505. P. 1–44.
6. *Green D.E.*, *Vande-Zande H.D.* Universal energy principle of biological systems and the unity of bioenergetics // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1981. V. 78. P. 5344–5347.
7. *Никольс Д.Дж.* Биоэнергетика. Введение в хемиосмотическую теорию. — М.: Мир, 1985. — 190 с.
8. *Nicholls D.G.*, *Ferguson S.J.* Bioenergetics 2 // San Diego: Academic Press, 1992, CA.
9. *Скулачев В.П.* Энергетика биологических мембран. — М.: Наука, 1989. — 564 с.
10. *Страйер Л.* Биохимия. В 3-х томах / Пер. с англ. — М.: Мир, 1985. Т. 2. — 308 с.
11. *Dudkina N.V.*, *Eubel H.*, *Keegstra W.*, *Boekema E.J.*, *Braun H.P.* Structure of a mitochondrial supercomplex formed by respiratory-chain complexes I and III // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2005. V. 102. P. 3225–3229.
12. *Gao X.*, *Wen X.*, *Esser L.*, *Quinn B.*, *Yu L.*, *Yu C.-A.*, *Xia D.* Structural basis for the quinone reduction in the bc(1) complex: a comparative analysis of crystal structures of mitochondrial cytochrome bc(1) with bound substrate and inhibitors at the Q(I) site // Biochemistry. 2003. V. 42. P. 9067–9080.
13. *Tsukihara T.*, *Shimokata K.*, *Katayama Y.*, *Shimada H.*, *Muramoto K.*, *Aoyama H.*, *Mochizuki M.*, *Shinzawa-Itoh K.*, *Yamashita E.*, *Yao M.*, *Ishimura Y.*, *Yoshikawa S.* The low-spin heme of cytochrome c oxidase as the driving element of the proton-pumping process // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 2003. V. 100. P. 15304–15309.
14. *Menz R.I.*, *Walker J.E.*, *Leslie A.G.* Structure of bovine mitochondrial F(1)-ATPase with nucleotide bound to all three catalytic sites: implications for the mechanism of rotary catalysis // Cell. 2001. V. 106. P. 331–341.
15. *Boyer P.D.* Toward an adequate scheme for the ATP synthase catalysis // Biokhimiya. 2001. V. 66. P. 1058–1066.
16. *Yankovskaya V.*, *Horsefield R.*, *Tornroth S.*, *Luna-Chavez C.*, *Miyoshi H.*, *Leger C.*, *Byrne B.*, *Cecchini G.*, *Iwata S.* Architecture of succinate dehydrogenase and reactive oxygen species generation // Science. 2003. V. 299. P. 700–704.
17. *Lancaster C.R.D.*, *Kroger A.*, *Auer M.*, *Michel H.* Structure of fumarate reductase from Wolinella succinogenes at 2.2 angstroms resolution // Nature. 1999. V. 402. P. 377–385.

18. *Iwata S.*, *Lee J.W.*, *Okada K.*, *Lee J.K.*, *Iwata M.*, *Rasmussen B.*, *Link T.A.*, *Ramaswamy S.*, *Jap B.K.* Complete structure of the 11-subunit mitochondrial cytochrome bc1 complex // Science. 1998. V. 281. P. 64–71.
19. *Kurisu G.*, *Zhang H.*, *Smith J.L.*, *Cramer W.A.* Structure of the cytochrome b6f complex of oxygenic photosynthesis: tuning the cavity // Science. 2003. V. 302. P. 1009–1014.
20. *Smith J.L.*, *Zhang H.*, *Yan J.*, *Kurisu G.*, *Cramer W.A.* Cytochrome bc complexes: a common core of structure and function surrounded by diversity in the outlying provinces // Curr. Opin. Struct. Biol. 2004. V. 14. P. 432–439.
21. *Mitchell P.* The protonmotive Q cycle: a general formulation // FEBS Lett. 1975. V. 59. P. 137–139.
22. *Crofts E.A.*, *Berry A.R.* Structure and function of the cytochrome bc1 complex of mitochondria and photosynthetic bacteria // Curr. Opin. Struct. Biol. V. 8. 1998. P. 501–509.
23. *Michel H.* Cytochrome c oxidase: catalytic cycle and mechanisms of proton pumping — a discussion // Biochemistry. 1999. V. 38. P. 15129–15140.
24. *Ostermeier C.*, *Harrenga A.*, *Ermler U.*, *Michel H.* Structure at 2,7 Åresolution of the Paracoccus denitrificans two subunits cytochrome c oxidase complexed with an antibody FV fragment // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1997. V. 94. P. 10547–10553.
25. *Yoshikawa S.*, *Shinzawa-Itoh K.*, *Nakashima R.*, *Aono R.*, *Yamashita E.*, *Inoue N.*, *Yao M.*, *Fei M.J.*, *Libeu C.P.*, *Mizushima T.*, *Yamaguchi Y.*, *Tomizaki T.*, *Tsukihara T.* Redox-coupled crystal structural changes in bovine heart cytochrome c oxidase // Science. 1998. V. 280. P. 1723–1729.
26. *Svensson-Ek M.*, *Abramson J.*, *Larsson G.*, *Törnroth S.*, *Brzezinski P.*, *Iwata S.* The X-ray crystal structures of wild-type and EQ(I-286) mutant cytochrome c oxidases from Rhodobacter sphaeroides // J. Mol. Biol. 2002. V. 321. P. 329–339.
27. *Brzezinski P.*, *Larsson G.* Redox-driven proton pumping by heme-copper oxidases // Biochim. Biophys. Acta. 2003. V. 1605. P. 1–13.
28. *Ädelroth P.*, *Brzezinski P.* Surface-mediated proton-transfer reactions in membrane-bound proteins // Biochim. Biophys. Acta. 2004. V. 1655. P. 102–115.
29. *Wikstrom M.*, *Verkhovsky M.I.*, *Hummer G.* Water-gated mechanism of proton translocation by cytochrome c oxidase // Biochim. Biophys. Acta. 2003. V. 1604. P. 61–65.
30. *Drory O.*, *Frolow F.*, *Nelson N.* Crystal structure of yeast V-ATPase subunit c reveals its stator function // EMBO rep. 2004. V. 5. P. 1148–52.
31. *Stock D.*, *Gibbons C.*, *Arechaga I.*, *Leslie A.G.*, *Walker J.E.* The rotary mechanism of ATP synthase // Curr. Opin. Struct. Biol. 2000. V. 10. P. 672–679.
32. *Boyer P.D.* Coupling mechanisms in capture, transmission, and use of energy // Annu. Rev. Biochem. 1977. V. 46. P. 957–966.
33. *Cross R.L.* The mechanism and regulation of ATP synthesis by F1-ATPase // Annu. Rev. Biochem. 1981. V. 50. P. 681–714.
34. *Boyer P.D.*, *Kohlbrenner W.E.* The present status of the binding-change mechanism and its relation to ATP formation by chloroplasts // In: Energy Coupling in Photosynthesis (Eds. B. Selman, S. Selman-Reiner) N. Y.: Elsevier / North Holland, 1981. P. 231–240.
35. *Boyer P.D.* The binding change mechanism for ATP synthase–some probabilities and possibilities // Biochim. Biophys. Acta. 1993. V. 1140. P. 215–250.
36. *Abrahams J.P.*, *Leslie A.G.*, *Lutter R.*, *Walker J.E.* Structure at 2.8 Åresolution of F1-ATPase from bovine heart mitochondria // Nature. 1994. V. 370. P. 621–628.
37. *Gledhill J.R.*, *Montgomery M.G.*, *Leslie A.G.*, *Walker J.E.* How the regulatory protein, IF(1), inhibits F(1)-ATPase from bovine mitochondria // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2007. V. 104. P. 15671–15676.

38. *Duncan T.M.*, *Bulygin V.V.*, *Hutcheon M.S.*, *Cross R.L.* Rotation of subunits during catalysis by Escherichia coli F1-ATPase // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1995. V. 92. P. 10964–10968.
39. *Sabbert D.*, *Engelbrecht S.*, *Junge W.* Intersubunit rotation in active F-ATPase // Nature. 1996. V. 381. 623–625.
40. *Noji H.*, *Yasuda R.*, *Yoshida M.*, *Kinosita K.* Direct observation of the rotation of F1-ATPase // Nature. 1997. V. 386. P. 299–302.
41. *Yasuda R.*, *Noji H.*, *Yoshida M.* Kinosita K.Jr, Itoh H. Resolution of distinct rotational substeps by submillisecond kinetic analysis of F1-ATPase // Nature. 2001. V. 410. P. 898–904.
42. *Junge W.*, *Lill H.*, *Engelbrecht E.* ATP synthase: an electrochemical transducer with rotary mechanics // Trends Biol. Sci. 1997. V. 22. P. 420–423.
43. *Elston T.*, *Wang H.Y.*, *Oster G.* Energy transduction in ATP synthase // Nature. 1998. V. 391. P. 510–513.
44. Lancaster CR. The role of electrostatics in proton-conducting membrane protein complexes // FEBS Lett. 2003. V. 545. P. 52–60.
45. *Чернавская Н.М.*, *Чернавский Д.С.* Туннельный транспорт электронов в фотосинтезе. — М.: Изд.-во МГУ, 1977. — 175 с.
46. *DeVault D.*, *Chance B.* Studies of photosynthesis using a pulsed laser. I. Temperature dependence of cytochrome oxidation rate in chromatium. Evidence for tunneling // Biophys. J. 1966. V. 6. P. 825–847.
47. *DeVault D.*, *Parkes J.H.*, *Chance B.* Electron tunnelling in cytochromes // Nature. 1967. V. 215. P. 642–644.
48. *Hopfield J.J.* Electron transfer between biological molecules by thermally activated tunneling // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1974. V. 71. P. 3640–3644.
49. *Jortner J.* Temperature dependent activation energy for electron transfer between biological molecules // J. Chem. Phys. 1976. V. 64(12). P. 4860–4867.
50. *Yocom K.M.*, *Shelton J.B.*, *Shelton J.R.*, *Schroeder W.A.*, *Worosila G.*, *Isied S.S.*, *Bordignon E.*, *Gray H.B.* Preparation and characterization of a pentaammine-ruthenium (III) derivative of horse heart ferricytochrome c // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1982. V. 79. P. 7052–7055.
51. *Бенсассон Р.*, *Лэнд Э.*, *Траскот Т.* Флеш-фотолиз и импульсный радиолиз: Применение в биохимии и медицинской химии / Пер. с англ. — М.: Мир, 1987. — 398 с.
52. *Winkler J.R.*, *Nocera D.G.*, *Yocom K.M.*, *Bordignon E.*, *Gray H.B.* Electron-transfer kinetics of pentaaminеruthenium(III) (histidine-33)-ferricytochrome c. Measurment of the rate of intramolecular electron transfer between redox centers separated by 15 Å in a protein // J. Am. Chem. Soc. 1982. V. 104. P. 5798–5800.
53. *Kobayashi K.*, *Une H.*, *Hayashi K.* Electron transfer process in cytochrome oxidase after pulse radiolysis // J. Biol. Chem. 1989. V. 264. P. 7976–7980.
54. *Gray H.B.*, *Winkler J.R.* Electron tunneling through proteins // Q. Rev. Biophys. 2003. V. 36. P. 341–372.
55. *Margalit R.*, *Pecht I.* Gray H.B Oxidation reduction catalytic activity of a pentaammineruthenium (III) derivative of sperm whale myoglobin // J. Am. Chem. Soc. 1983. V. 105. P. 301–302.
56. *Osvath P.*, *Salmon G.A.*, *Sykes A.G.* Preparation, characterization, and intramolecular rate-constant for ru(II)-fe(III) electron-transfer in the pentaammineruthenium histidine modified cytochrome-c551 from Pseudomonas-stutzeri // J. Am. Chem. Soc. 1988. V. 110(21). P. 7114–7118.
57. *Jacobs B.A.*, *Mauk M.R.*, *Funk W.D.*, *MacGillivray R.T.A.*, *Mauk A.G.*, *Gray H.B.* Preparation, characterization, and intramolecular electron-transfer in pentaammineruthenium

histidine-26 cytochrome-b5 derivatives - role of the intervening medium in long-range donor-acceptor electronic coupling // J. Am. Chem. Soc. 1991. V. 113. P. 4390–4394.

58. *McGourty J.L.*, *Peterson-Kennedy S.E.*, *Ruo W.Y.*, *Hoffman B.M.* Characterization of long-range electron transfer in mixed-metal [zinc, iron] hybrid hemoglobins // Biochemisty. 1987. V. 26. P. 8302–8312.
59. *Jackman M.P.*, *Lim M.S.*, *Sykes A.G.*, *Salmon G.A.* Preparation, characterization, and intramolecular electron-transfer studies on the penta-ammineruthenium histidine-modified high-potential iron-sulfur protein from chromatium-vinosum // J. Chem. Soc. Dalton Trans., 1988, № 11. P. 2843–2850.
60. *Heacock D.H.* 2nd, *Liu R.Q.*, *Yu C.A.*, *Yu L.*, *Durham B.*, *Millett F.* Intracomplex electron transfer between ruthenium-cytochrome c derivatives and cytochrome C. 1 // J. Biol. Chem. 1993. V. 268. P. 27171–27175.
61. *Margalit R.*, *Kosti N.M.*, *Che C.-M.*, *Blair D.F.*, *Chang H.-J.*, *Oecht I.*, *Shelton J.B.*, *Schroeder W.A.*, *Gray H.B.* Praparation and characterization of pentaammineruthenium-(histidine-83)azurin: Thermodynamics of intramolecular electron transfer from ruthenium to copper // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1984. V. 81. P. 6554–6558.
62. *Jackman M.P.*, *McGinnis J.*, *Powls R.*, *Salmon G.A.*, *Sykes A.G.* Preparation and characterization of 2 His-59 ruthenium-modified algal plastocyanins and an unusually small rate-constant for ruthenium(II)-copper(II) intramolecular electron-transfer over approximately 12-a // J. Am. Chem. Soc. 1988. V. 110. P. 5880–5887.
63. *Farver O.*, *Pecht I.* Long-range intramolecular electron transfer in azurins // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1989. V. 86. P. 6968–6972.
64. *Nilsson T.* Photoinduced electron transfer from tris(2,2′-bipyridyl)ruthenium to cytochrome c oxidase // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1992. V. 89. P. 6497–6501.
65. *Miller J.E.* Di Bilio A. J., Wehbi W. A., Green M. T., Museth A. K., Richards J. R., Winkler J. R., Gray H. B. Electron tunneling in rhenium-modified Pseudomonas aeruginosa azurins // Biochim.Biophysic. Acta. 2004. V. 1655. P. 59–63.
66. *Farver O.*, *Lu Y.*, *Ang M.C.*, *Pecht I.* Enhanced rate of intramolecular electron transfer in an engineered purple CuA azurin // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1999. V. 96. P. 899–902.
67. *Farver O.*, *Jeuken L.J.*, *Canters G.W.*, *Pecht I.* Role of ligand substitution on long-range electron transfer in azurins // Eur. J. Biochem. 2000. V. 267. P. 3123–3129.
68. *Stuart-Audette M.*, *Blouquit Y.*, *Faraggi M.*, *Sicard-Roselli C.*, *Houée-Levin Ch.*, *Jollès P.* Re-evaluation of intramolecular long-range electron transfer between tyrosine and tryptophan in lysozymes. Evidence for the participation of other residues // Eur. J. Biochem. 2003. V. 270. P. 3565–3571.
69. *Marcus R.A.*, *Sutin N.* Electron transfer in chemistry and biology // Biochim. Biophys. Acta. 1985. V. 811. P. 265–322.
70. *Gray H.B.*, *Winkler J.R.* Electron transfer in proteins // Annu. Rev. Biochem. 1996. V. 65. P. 537–561.
71. *Wuttke D.S.*, *Gray H.B.* Protein engineering as a tool for understanding electron-transfer - Curr. Opinion Struct. Biol. 1993. V. 3(4). P. 555–563.
72. *Ramasarma T.* A perspective of biological electron transfer // Indian J. Biochem. Biophys. 1999. V. 36. P. 379–397.
73. *Porath D.*, *Bezryadin A.*, *de Vries S.*, *Dekker C.* Direct measurement of electrical transport through DNA molecules // Nature. 2000. V. 403. P. 635–638.
74. *Eisinger J.*, *Shulman R.G.* Excited electronic states of DNA // Science. 1968. V. 161. P. 1311–1319.
75. *Fromherz P.* Rieger B Photoinduced electron-transfer in dna matrix from intercalated ethidium to condensed methylviologen - J. Am. Chem. Soc. 1986. V. 108. P. 5361–5362.

76. *Barton J.K.*, *Kumar C.V.*, *Turro N.J.* DNA-mediated photoelectron transfer-reactions // J. Am. Chem. Soc. 1986. V. 108. P. 6391–6393.
77. *Holmin R.E.*, *Dandlicker P.J.*, *Barton J.K.* Charge transfer through the DNA base stack // Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 1997. V. 36. P. 2714–2730.
78. *Houee-Levin C.*, *Gardes-Albert M.*, *Rouscilles A.*, *Ferradini C.*, *Hickel B.* Intramolecular semiquinone disproportionation in DNA. Pulse radiolysis study of the one-electron reduction of daunorubicin intercalated in DNA // Biochemistry. 1991. V. 30. P. 8216–8222.
79. *Fuciarelli A.F.*, *Sisk E.C.*, *Miller J.H.*, *Zimbrick J.D.* Radiation-induced electron migration in nucleic acids // Int. J. Radiat. Biol. 1994. V. 66. P. 505–509.
80. *Heeger A.* Semiconducting and metallic polymers: the fourth generation of polymeric materials (Nobel lecture) // Angew. Chem. Int. Ed. 2001. V. 40. P. 2591–2611.
81. *Liu T.*, *Barton J.K.* DNA Electrochemistry through the Base Pairs Not the Sugar-Phosphate Backbone // J. Am. Chem. Soc. 2005. V. 127. P. 10160–10161.
82. *Borrows C.J.*, *Muller J.G.* Oxidative Nucleobase Modifications Leading to Strand Scission // Chem. Rev. 1998. V. 98. P. 1109–1152.
83. *Heller A.* Spiers Memorial Lecture. On the hypothesis of cathodic protection of genes // Faraday Discuss. 2000. V. 116. P. 1–13.
84. *Hall D.B.*, *Holmin R.E.*, *Barton J.K.* Oxidative DNA damage through long-range electron transfer // Nature. 1996. V. 382. P. 731–735.
85. *Taylor J.S.* Unraveling the molecular pathway from sunlight to skin-cancer. - Acc. Chem. Res. 1994. V. 27. P. 76–82.
86. *Dandliker P.J.*, *Holmin R.E.*, *Barton J.K.* Oxidative thymine dimer repair in the DNA helix // Science. 1997. V. 275. P. 1465–1468.
87. *Giese B.* Long-distance electron transfer through DNA // Annu. Rev. Biochem. 2002. V. 71. P. 51–70.
88. *Takada T.*, *Kawai K.*, *Fujitsuka M.*, *Majima T.* Direct observation of hole transfer through double-helical DNA over 100 Å // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2004. V. 101. P. 14002–14006.
89. *Voityuk A.A.* Charge transfer in DNA: hole charge is confined to a single base pair due to solvation effects // J. Chem. Phys. 2005. V. 122. P. 204904.
90. *Su X.*, *Smith L.M.* Demonstration of a universal surface DNA computer // Nucleic Acids Res. 2004. V. 32. P. 3115–3123.
91. Möglich F., Schön M. Zur Frage der Energiewanderung in Kristallen und Molekülkomplexen // Naturwissensch. 1938. Bd. 26. S. 199.
92. *Jordan P.* Über die physikalische Strukture organischen Riesenmoleküle // Naturwissensch., 1938, B.26. S. 693–694.
93. *Szent-Györgyi A.* Towards a new biochemistry? // Science. 1941. V. 93. P. 609–611.
94. *Wirtz K.* Wasserstoffbindung, Struktur und Energietranspot bei Proteinen // Z. Naturforsch. 1947. Bd. 2b. S. 94–97.
95. *Schmitt W.* Hypothese über ein Electronen und Energieleitugsystem in Eiweissmolecülen // Z. Naturforsch. 1947. Bd. 2b. S. 98–104.
96. *Evans M.G.*, *Gergely T.A.* A discussion of possibility of band of energy levels in proteins. Electronic interaction in non-bonded systems // Biochim. Biophys. Acta. 1949. V. 3. P. 188–197.
97. *Suard M.*, *Bertier G.*, *Pullman B.* Sur les états électroniqes des protéins // Biochim. Biophys. Acta. 1961. V. 52. P. 254–265.
98. *Ладик Я.* Квантовая химия для химиков и биологов. — М.: Мир, 1975. — 256 с.
99. *Бриллюэн Л.* Гигантские молекулы и полупроводники // В кн. «Горизонты биохимии». — М.: Мир, 1964. С. 225–243.

100. *Suchai S.* Theoretical investigation of semiconductive properties in proteins. I. Electrical conductivity, charge mobilities and free path in β-poliglycine // Biopolymers. 1974. V. 13. P. 1731–1737.
101. *Kharkyanen V.N.*, *Petrov E.G.*, *Ukrainskii I.I.* Donor-acceptor model of electron transfer through protein // J. Theor. Biol. 1978. V. 73. P. 29–50.
102. *Петров Э.Г.* Физика переноса зарядов в биосистемах. Киев: Наукова думка, 1984. — 368 с.
103. *Suchai S.* Energy bands and electronic delocalization in the sugar-phosphate backbone of DNA // Biopolymers. 1974. V. 13. P. 1739–1745.
104. *Davydov A.S.* Solitons and energy transfer along protein molecules // J. Theor. Biol. 1977. V. 66. P. 379–87.
105. *Davydov A.S.* Excitons and solitons in molecular systems // Int. Rev. Cytol. 1987. V. 106. P. 183–225.
106. *Полторак О.М.* О механизмах ферментативных реакций и теории цепей перераспределения связей. — Ж. физ. химии. 1972. Т. 46. С. 1361–1379.
107. *Полторак О.М.* Элементарные акты гетеролитических реакций органической химии и ферментативного катализа и теория цепей перераспределения связей // Вест. МГУ. 1974. Т. 15. С. 3–29.
108. *Рубин А.Б.* Биофизика. В 2-х томах. Т. 1. Теоретическая биофизика. — М.: Изд-во МГУ, 2004. — 462 с.
109. *Metzler D.E.* Tautomerism in pyridoxal phosphate and in enzymatic catalysis // Adv. Enzymol. 1979. V. 50. P. 1–40.
110. *Metzler D.E.*, *Metzler C.M.* Biochemistry: The chemical reactions of living cells / 2 ed. San Diego e.a.: Harcourt acad. press. 2001. V. 1. P. 1–937. V. 2. P. 938–1973.
111. *Blow D.M.*, *Birktoft J.J.*, *Hartley B.S.* Role of a buried acid group in the mechanism of action of chimotrypsin // Nature. 1969. V. 221. P. 337–340.
112. *Takano T.*, *Dickerson R.E.* Redox conformation changes in refined tuna cytochrome c // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1980. V. 77. P. 6371–6375.
113. *Salemme F.R.*, *Freer S.T.*, *Xuong Ng.H. et al.* tructure of oxidized cytochrome C. 2. of Rhodospirillum rubrum // J. Biol. Chem. 1973. V. 248. P. 3910–3921.

Часть II

СИСТЕМНО-МЕТОДОЛОГИЧЕСКИЙ ПОДХОД

Глава 5

КОНЦЕПЦИЯ СИСТЕМ СОПРЯЖЕННЫХ ИОННО-ВОДОРОДНЫХ СВЯЗЕЙ

5.1. Основные понятия и представления

Первоначально концепция ССИВС была развита для объяснения особенностей строения и работы биоструктур [1–3]. В дальнейшем она была положена в основу модели молекулярной электроники [4, 5], трактующей введенные понятия гораздо шире. Однако, поскольку биоструктуры — работающие устройства, то они и составляющие их звенья могут служить прототипами, на которые ориентируется наш подход.

Концепция основана на допущении, что элементы биоструктур, биомолекулы (аминокислоты, азотистые основания, липиды и т. д.) обладают неким системообразующим свойством, обеспечивающим их участие в формировании биоструктур и в переносе энергии в этих структурах. Анализ литературы, проведенный в гл. 2, показывает, что таким свойством является, вероятно, способность функциональных групп биомолекул к формированию систем с участием водородных связей. Однако, в силу очевидности, это свойство, практически не анализировалось. Данная глава, являющаяся одной из основных в книге, посвящена этому анализу.

5.1.1. Понятия простой и резонансной группы. Таблица групп, встречающихся в составе биомолекул. С целью выделения искомого системообразующего свойства в составе биологических молекул были выделены два типа минимальных сочетаний атомов — простые и резонансные группы.

Простой группой (**R–Z**) называется сочетание из двух атомов элементов — органогенов (C, N, O, P, S), содержащее одинарную σ-связь.

Резонансной группой (**Q–R=X**) называется сочетание из трех атомов элементов-органогенов, содержащее две σ- и одну π-связь, способную к перемещению, резонансу: Q–R=X ↔ Q=R–X [1–5]. В этом понятии в обобщенном виде используются представления о резонансе двойных связей, развитые Л. Полингом [6]. В работах [1, 2] была предложена таблица, систематизирующая эти группы, расположенные в порядке возрастания молекулярной массы (табл. 5.1).

На основе анализа табл. 5.1 можно сделать следующие выводы:

Таблица 5.1

Типы групп, встречающиеся в биомолекулах

Простые группы	Резонансные группы		
C–C	C–C=C		
C–N	C–C=N	N–C=N	
C–O	C–C=O	N–C=O	O–C=O
C–S	C–C=S	N–C=S	O–C=S
—	**C–P=O**	**N–P=O**	**O–P=O**
S–S	**C–S=O**	**N–S=O**	**O–S=O**

— в группах, составляющих биомолекулы, используются сочетания лишь из пяти элементов-органогенов;

— количество таких сочетаний ограниченно — лишь 5 простых и 15 резонансных групп;

— резонансные группы подразделяются на три семейства: углерода (9 групп с углеродом в центре), фосфора (3 группы) и серы (также 3 группы).

Эта таблица отражает результат отбора биомолекул в биоструктуры. Она позволяет предполагать, что для своей работы в составе биоструктур биомолекулы должны содержать лишь ограниченный набор сочетаний элементов с определенными особенностями их электронной конфигурации.

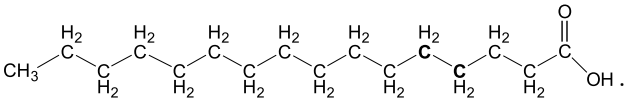
Данная классификация полезна и для молекулярной электроники, так как позволяет осуществить первичную оценку пригодности молекул для построения элементной базы последней. Если в молекулах, входящих в состав работающих биоструктур, другие группы не найдены, то это значит, что данные сочетания не годятся, вероятно, и для молекулярной электроники. Примером могут служить группы типа N–N=N, N–N=O, O–N=O и т. д., которые не представлены в табл. 5.1. Соединения, содержащие такие сочетания, в составе биомолекул не найдены.

В работах [1, 2] была приведена также таблица распределения биомолекул в соответствии с данными группами. В этой книге мы будем ее повторять, а рассмотрим характерные примеры, позволяющие научиться выделять эти группы. Хотя некоторые биомолекулы уже были показаны (гл. 2), их сопоставление позволяет увидеть ту общность, которая ускользает от внимания из-за различий в структуре.

5.1.2. Биомолекулы, содержащие простые и резонансные группы. *Биомолекулы с простыми группами.* Практически все биомолекулы, как входящие в состав звеньев биологических макромолекул (например, белков, полисахаридов, липидов), содержат сочетания с простыми группами.

Наиболее часто встречается сочетание **C–C**, которое имеется почти во всех биомолекулах. Большее число C–C-групп содержат жирные кислоты, входящие в состав

разнообразных липидов (схема 5.1):

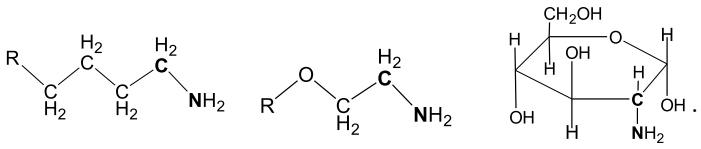


(5.1)

Пальмитиновая кислота

В этой молекуле каждая C–C-группа связана с другой C–C-группой одинарной связью. Одна из групп на рисунке выделена жирными буквами.

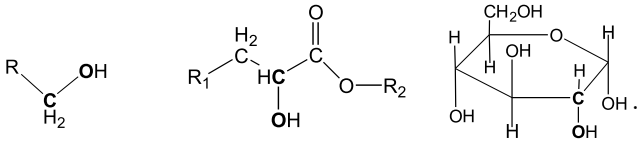
Сочетание **C–N** встречается в белках в аминокислоте лизин, в азотистых основаниях фосфолипидов и в аминосахарах полисахаридов (схема 5.2):



(5.2)

Лизин Этаноламин D-глюкозамин

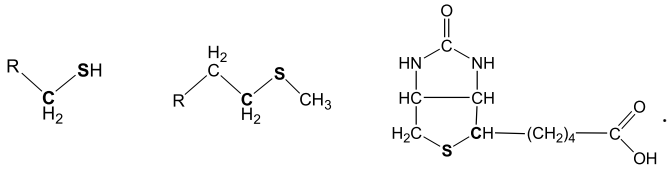
Группа **C–O** присутствует в составе аминокислот серина и треонина, в липидах — в холестерине и 2-оксикислотах и во всех сахарах (схема 5.3):



(5.3)

Серин 2-оксикислота D-глюкоза

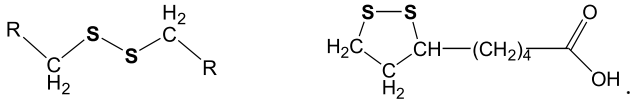
Группа **C–S** входит в состав боковых цепей аминокислот цистеина и метионина, а также в циклический кофактор биотин (схема 5.4):



(5.4)

Цистеин Метионин Биотин

Наконец, группа **S–S** (дисульфидная группа) присутствует в белках как два связанных между собой цистеина (цистин) и в составе кофактора липоевой кислоты (схема 5.5):

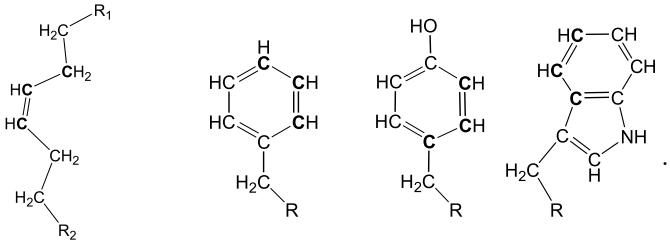


(5.5)

Цистин Липоевая кислота

Выделение резонансных групп в биомолекулах. В составе биомолекул резонансные группы мы также будем выделять жирными буквами. Первой резонансной

группой в табл. 5.1 является группа **C–C=C**. Она присутствует как в ациклических биомолекулах, например с составе ненасыщенных жирных кислот всех липидов, так и в циклических биомолекулах, например в составе аминокислот фенилаланина, тирозина и триптофана (схема 5.6):

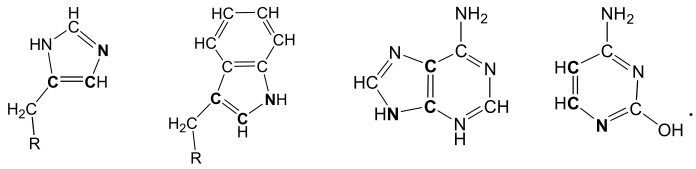


Фрагмент жирной кислоты Фениналанин Тирозин Триптофан

(5.6)

Следует отметить, что на приведенных структурах возможно выделение нескольких вариантов резонансных групп C–C=C. Например, на фрагменте жирной кислоты выделен атом углерода из цепи с R_1. С таким же успехом можно выделить атом углерода из цепи с R_2. Это будет относиться и к другим резонансным группам, что связано, согласно определению, со способностью их к перемещению, резонансу.

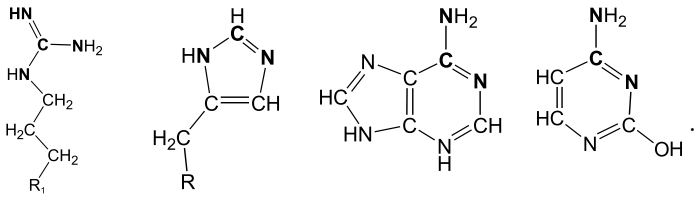
Во втором сверху ряду табл. 5.1 находятся резонансные группы **C–C=N** и **N–C=N**. Можно отметить, что во многих случаях эти группы встречаются в одних и тех же молекулах. Резонансные группы **C–C=N** присутствуют в аминокислотах гистидине и триптофане, а также в азотистых основаниях нуклеиновых кислот, например, в аденине и цитозине (схема 5.7):



Гистидин Триптофан Аденин Цитозин

(5.7)

Группы **N–C=N** можно выделить в составе боковых цепей аминокислот аргинина (в нем наблюдается суперпозиция (наложение) двух групп **N–C=N**), и гистидина, а также в азотистых основаниях нуклеиновых кислот — аденине, цитозине и других (схема 5.8):

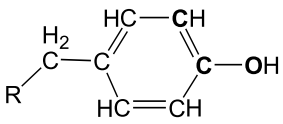


Аргинин Гистидин Аденин Цитозин

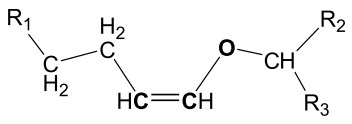
(5.8)

В третьей строке таблицы групп находятся три резонансных группы: **C–C=O**, **N–C=O** и **O–C=O**. Группа **C–C=O** в составе биомолекул, по сравнению с другими

группами этой строки встречается редко. Молекулами, содержащими эту группу, являются аминокислота тирозин, а также винильно-эфирная связь в фосфолипидах (плазмалогенах) (схема 5.9):



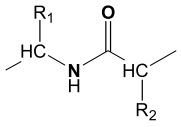
Тирозин



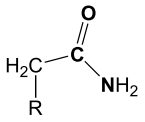
Винильно-эфирная связь в липидах

(5.9)

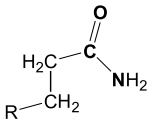
Резонансная группа **N–C=O** относится к числу самых распространенных. Она встречается в виде пептидной связи основной цепи белков, в боковых цепях аминокислот аспарагина и глютамина, в азотистых основаниях нуклеиновых кислот (в оксипуринах и оксипириминах), в качестве так называемой церамидной связи жирных кислот со сфингозином в липидах (схема 5.10):



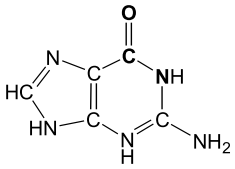
Пептидная связь



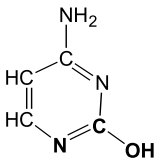
Аспарагин



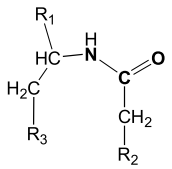
Глютамин



Гуанин



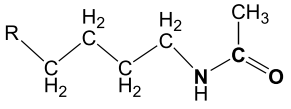
Цитозин



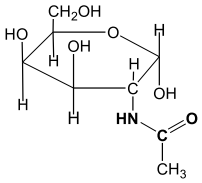
Церамидная связь в липидах

(5.10)

Эта группа присутствует в упоминавшемся выше биотине, а также в ряде кофакторов, таких как никотинамид, флавины и т. д. Кроме того, она образуется при N-ацетилировании и N-формилировании ряда биомолекул, например, лизина, аминосахаров гликолипидов и полисахаридов (схема 5.11):



N-ацетиллизин

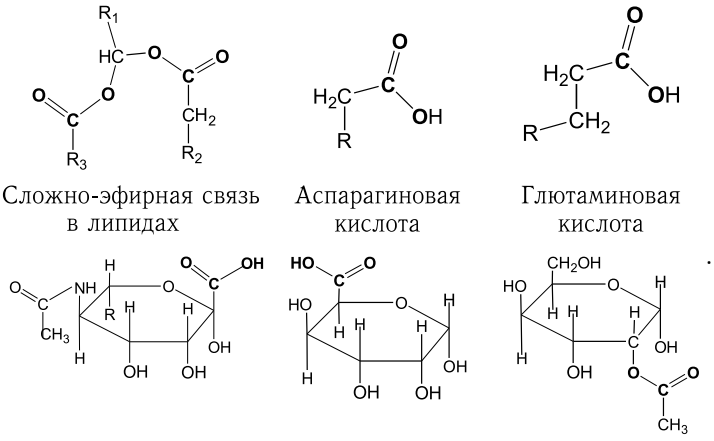


N-ацетилгалактозамин

(5.11)

Последней группой этой строки является резонансная группа O–C=O. Эта группа встречается в составе аспарагиновой и глютаминаовой аминокислот в белках, в связанном виде — в сложно-эфирной связи жирных кислот с глицерином в фосфолипи-

дах, в составе N-ацетилнейраминовой кислоты в гликолипидах, а также в уроновых кислотах и О-ацетилированных сахарах полисахаридов (схема 5.12):

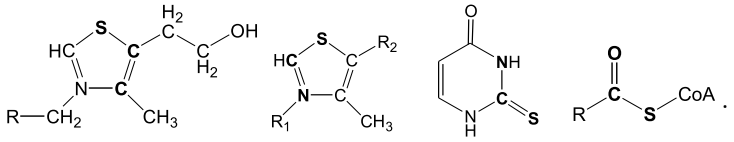


Сложно-эфирная связь в липидах | Аспарагиновая кислота | Глютаминовая кислота

N-ацетилнейраминовая кислота гликолипидов | Глюкуроновая кислота | О-ацетилглюкоза

(5.12)

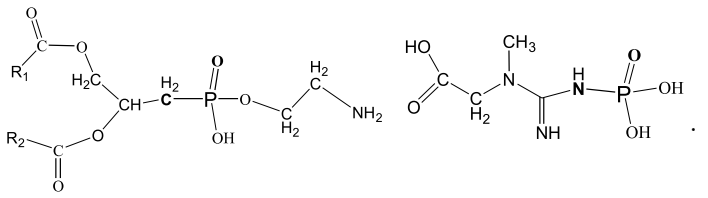
Последняя строка семейства резонансных групп углерода содержит три группы: C–C=S, N–C=S и O–C=S. Они довольно редко встречаются, присутствуя, в основном, в составе тиамина (витамина B_1), в минорном азотистом основании тиоурациле в нуклеиновых кислотах, а также в ацил-CoA, кофакторе синтеза жирных кислот (схема 5.13):



Резонансные группы в витамине B_1 | Тиоурацил | Ацил CoA

(5.13)

Редко встречающиеся группы C–P=O и N–P=O семейства резонансных групп фосфора представлены, соответственно, в фосфонолипидах и в креатинфосфате, кофакторе мышечного сокращения (5.14):

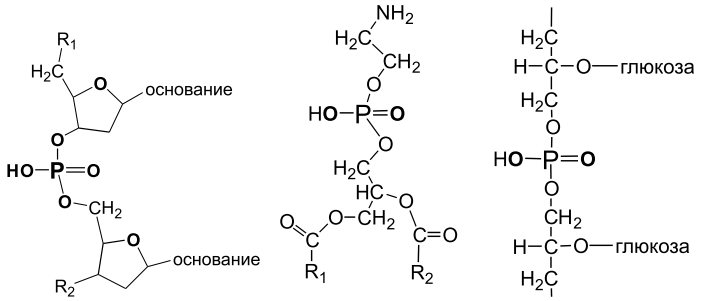


Фосфонолипид | Креатинфосфат

(5.14)

Гораздо чаще встречается O–P=O-группа. Она служит соединительным мостиком для нуклеотидов в нуклеиновых кислотах, диглицеридной части и азотистого основания в фосфолипидах, и элеменарных звеньев тейхоевых кислот, входящих

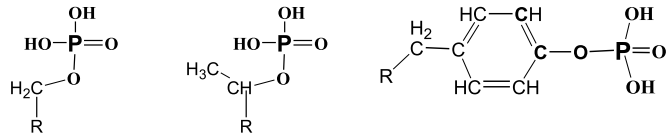
в клеточные стенки бактерий (5.15):



(5.15)

Фрагмент нуклеиновых кислот | Фосфолипид | Фрагмент тейхоевой кислоты

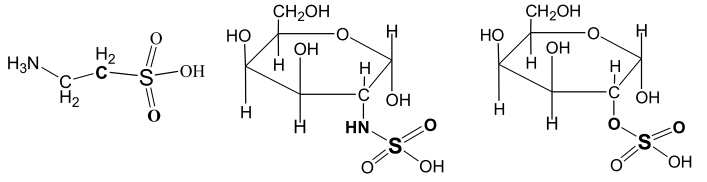
В дополнение к этому, большинство превращений биологических молекул начинается с их фосфорилирования. В белках также обнаруживаются боковые цепи аминокислот с фосфатной группой — фосфосерин, фосфотреонин и фосфотирозин (схема 5.16). Отметим, что фосфотирозин появляется в большом количестве в злокачественных новообразованиях 7].



(5.16)

Фосфосерин | Фосфотреонин | Фосфотирозин

Последним в табл. 5.1 является семейство резонансных групп серы. Группа C–C=S встречается в таурине, продукте обмена стероидов, N–C=S — в N-сульфированных аминосахарах, а O–S=O в O-сульфатированных сахарах гликолипидов (сульфатидов) и полисахаридов (схема 5.17):



(5.17)

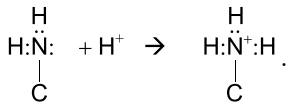
Таурин | N-сульфированные аминосахара | O-сульфатированные сахара

Приведенные примеры показывают, что все группы, представленные в табл. 5.1, реально присутствуют в биомолекулах. В разных классах биомолекул одна и та же группа, например, группа N–C=O, фигурирует в разных контекстах. Группы, которые в настоящее время выступают под разными названиями, например, гидроксильная (C–O) и аминогруппа (C–N) — это представители простых групп (R–X), а амидная (N–C=O) и карбоксильная (O–C=O) — резонанансных групп (Q–R=X). Такой унифицированный подход позволяет существенным образом продвинуться в понимании системообразующих свойств биомолекул.

5.1.3. Свойства групп, проявляемые по отношению к атомам водорода. Расположение простых и резонансных групп в виде таблицы позволяет провести систематический анализ свойств атомов этих групп по отношению к атомам водорода, с которыми, как видно из приведенных выше примеров, связаны эти группы в реальных молекулах. Такой обобщенный анализ ранее был проведен в работе [2]. Воспроизводим его с небольшими дополнениями. Как и ранее, при обозначении неподеленных пар электронов такой анализ удобно проводить с использованием формул Льюиса.

Простые группы. Группа C–C в связи с атомами водорода (CH_2–CH_2) при взаимодействии с другими аналогичными сочетаниями участвует в ван-дер-ваальсовых взаимодействиях (см. гл. 3, раздел 3.1.3).

В группе C–N два атома водорода присоединяются к атому азота ковалентной связью, однако наличие свободной неподеленной пары электронов позволяет присоединиться еще одному протону (схема 5.18):



(5.18)

Образуется заряженный ион $C–N^+H_3$, в котором заряд, привносимый избыточным протоном, равномерно распределяется между всеми тремя атомами водорода. Такая группа может участвовать в образовании трех протонодонорных водородных связей.

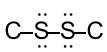
Атом кислорода в группе C–O и атом серы в группе C–S прочно связан с одним атомом водорода (схема 5.19):



(5.19)

При этом наличие еще двух неподеленных пар электронов создает возможность для образования двух дополнительных протоноакцепторных водородных связей с другими группами, помимо протонодонорной водородной связи самих групп C–O и C–S. Различие этих групп состоит в большей подвижности атома водорода у группы C–S.

Группа S–S встречается в биомолекулах только в связи с атомами углерода (схема 5.20)



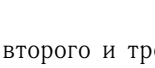
(5.20)

и может участвовать, в соответствии с числом неподеленных пар электронов, в четырех протоноакцепторных водородных связях с другими группами. Для простых групп можно отметить, таким образом, общую тенденцию к снижению способности образовывать протонодонорные водородные связи и к усилению способности образовывать протоноакцепторные водородные связи (в табл. 5.1 — сверху вниз).

Резонансные группы. Анализ резонансных групп упрощается тем, что эти группы содержат крайние атомы, аналогичные атомам простых групп той же строки табл. 5.1.

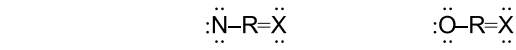
Резонансные группы первого столбца (типа C–R=X), за исключением группы C–C=C (считается, что атомы водорода, связанные с углеродом, водородных связей

не образуют), способны к образованию двух водородных связей, в соответствии с числом неподеленных пар электронов (схма 5.21):



(5.21)

Группы второго и третьего столбцов (типа N–C=R и O–C=R) способны к образованию, в соответствии с числом свободных неподеленных пар электронов, до пяти водородных связей с другими группами (схема 5.22):

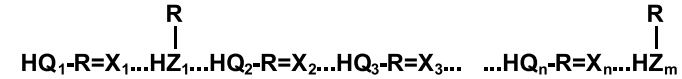


(5.22)

По мере увеличения молекулярной массы резонансных групп в табл. 5.1, как в пределах столбцов сверху вниз, так и в каждой строке справа налево, свойства этих групп в реальных молекулах будут изменяться в сторону увеличения протонодонорных свойств. Например, соединения, содержащие группу N–C=N-группу, как правило, проявляют основные свойства, N–C=O-группу — электронейтральны, а O–C=O и O–P=O группы — кислотные, обусловленные повышением подвижности присоединенных к ним протонов.

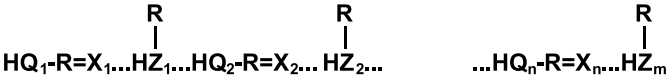
Таким образом, проведенный в этом разделе анализ показывает, что наиболее общим свойством групп табл. 5.1, а, следовательно, и молекул, их содержащих, является их способность к образованию водородных связей с другими группами. Для последующего анализа удобно использовать не конкретные группы, а обобщенные их обозначения: $R–X_1$, $R–X_2$……$R–X_m$ для простых групп и $Q_1–R=X_1$, $Q_2–R=X_2$……$Q_n–R=X_n$ для резонансных. Индексы после букв означают возможность подстановки вместо абстрактных групп конкретных групп из табл. 5.1, например, $R–X_1–C–N$, $R–X_2–C–O$, $Q_1–R=X_1–N–C=N$, $Q_2–R=X_2–O–C=O$ и т. д.

5.1.4. Системы на основе простых и резонансных групп, построенные с участием водородных связей. Взаимодействие между простыми и резонансными группами через атом водорода может приводить к образованию следующих систем (схема 5.23):



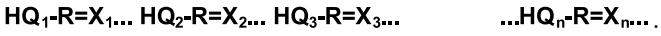
(5.23)

Предельными вариантами в этом случае являются системы, состоящие из регулярно чередующихся резонансных и простых групп (схема 5.24):



(5.24)

и системы, содержащие только резонансные группы (схема 5.25):



(5.25)

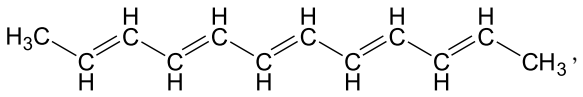
Наилучшим образом указанные системы будут образовываться из групп, обладающих противоположными свойствами, т. е. протонодоноров и протоноакцепторов. В зависимости от числа образованных водородных связей такие системы могут быть линейными и разветвленными, а также одномерными, двумерными и трехмерными. В дальнейшем мы будем использовать, в основном, неразветвленные и двумерные

виды систем, предполагая, что их свойства можно экстраполировать и на другие типы.

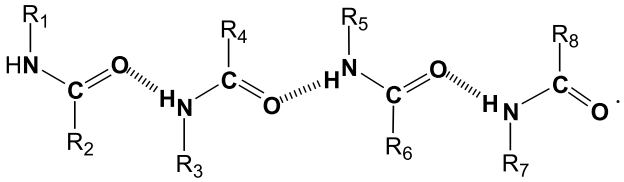
Предлагаемое формальное описание, характеризующее эти системы как определенный класс межмолекулярных взаимодействий, оказалось возможным только благодаря введению понятий простой и резонансной группы. В связи с этим возник вопрос об общих свойствах таких систем и названии этого выделенного класса систем.

5.1.5. Введение представлений о «системах сопряженных ионно-водородных связей» (ССИВС). Для обоснования названия выделенных систем были рассмотрены некоторые свойства водородных связей в системах с π-электронами. Наиболее подробно такие системы были проанализированы в работе [8]. Водородные связи этого типа бывают как межмолекулярными, так и внутримолекулярными. Величина энергии связи в них составляет 6–10 ккал/моль, т. е. они относятся к водородным связям средней силы и сильным. Кроме того, они характеризуются рядом свойств, обнаруживаемых физико-химическими методами: длинноволновым сдвигом в ИК-спектрах, большим химическим сдвигом протонного сигнала в ЯМР-спектрах и т. д. Такие системы, согласно [8], можно характеризовать донорно-акцепторным, ион-дипольным и π-электронным взаимодействиями.

Рассмотрим фрагмент какой-либо полисопряженной системы, например, полиацетилена (схема 5.26), и один из вариантов таких систем, например системы из HN–C=O-групп (схема 5.27):



(5.26)



(5.27)

Из сопоставления этих схем видно, что эти два типа систем очень похожи. В случае схемы 5.26 наблюдается чередование одинарных и двойных связей, а на схеме 5.27 такое чередование наблюдается для таких же систем, но включающих атомы водорода (выделены жирными буквами).

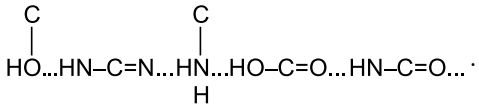
Учитывая сходство с полисопряженными системами, а также упомянутые типы взаимодействий, характерные для них, нами было предложено название «системы сопряженных ионно-водородных связей» (сокращенно — ССИВС) [1, 2]. На наш взгляд, в этом термине нашли отражение как донорно-акцепторный характер этих систем (ионно-водородные), так и наличие в их составе водородных связей.

Поскольку способность простых и резонансных групп к образованию ССИВС является одним из наиболее общих их свойств, то, следовательно, и биомолекулы, содержащие данные сочетания, также обладают свойством образовывать между собой непрерывные ССИВС. Таким образом, очевидно, что наиболее существенным системообразующим свойством биомолекул, как мы показали, является их способность к образованию ССИВС, которые могут служить основой для построения надмоле-

кулярных наноструктур, и, благодаря свойствам этих систем, каналами передачи энергии (заряда) в этих структурах.

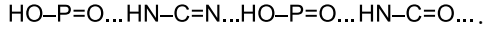
5.1.6. Универсальный характер ССИВС. Подставляя в ССИВС группы из табл. 5.1, обладающие противоположными свойствами, и далее, конкретные молекулы, можно строить разнообразные структуры на основе непрерывных ССИВС.

Приведем несколько примеров. Вместо групп Q–R=X и R–Z с нижними индексами $1, 2, n, \ldots$ подставим конкретные группы из табл. 5.1, вместе с присоединенными к ним атомами водорода, например C–OH, HN–C=N, C–NH, HO–C=O, HN–C=O (схема 5.28):



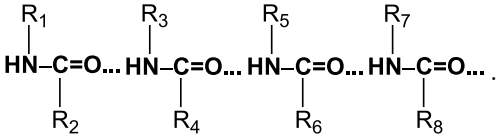
(5.28)

Другой пример: системы из групп HO–P=O, HN–C=N (схема 5.29):



(5.29)

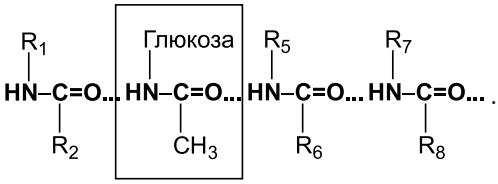
Наконец, третий пример, упоминавшиеся уже системы из HN–C=O-групп, пептидно-водородных связей (схема 5.30):



(5.30)

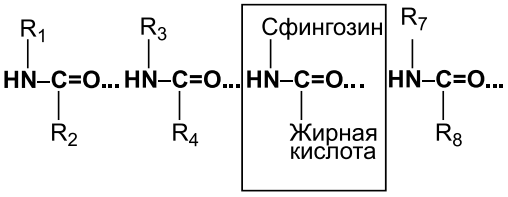
Рассмотрим последний пример более подробно. Предположим, что на схеме 5.30 вместо R_1 и R_2, R_3 и R_4, R_5 и R_6, R_7 и R_8 находятся α-углеродные атомы белка. Тогда это будет фрагмент α-спирали [9].

Если теперь вместо групп R_3 и R_4 подставить N-ацетилированный фрагмент глюкозамина, который входит в состав полисахарида, то получится комплекс белок-полисарид (схема 5.31):



(5.31)

Если же вместо R_5 и R_6 подставить фрагмент молекулы сфингомиелина — липида биомембран, то возникнет комплекс белка с фосфолипидом. (схема 5.32):



(5.32)

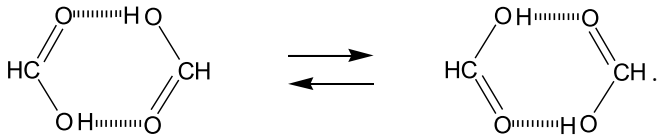
Таким образом, комплексы разные, а ССИВС остаются одни и те же. Это означает, что ССИВС подходят к описанию совершенно разных комплексов. В этом состоит универсальный характер ССИВС по отношению к бионическим наноструктурам.

Учитывая аналогию с биоструктурами, где такие системы широко распространены, был сформулирован первый принцип концепции ССИВС: бионические надмолекулярные наноструктуры должны строиться на основе непрерывных ССИВС [2–5]. Кратко его можно назвать «принцип непрерывности ССИВС» или «принцип континуальности ССИВС».

5.2. Модель переноса зарядов по ССИВС

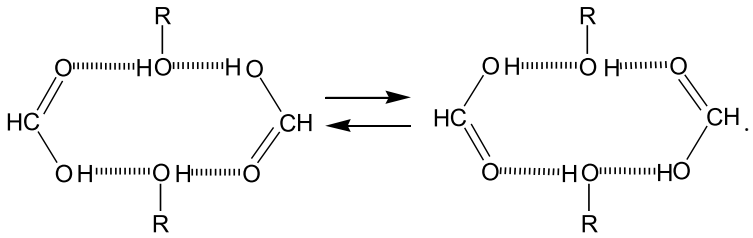
5.2.1. Исходные предпосылки модели. В общих чертах мы сохранили исходные предпосылки, изложенные в 1989 году [2], добавив к ним лишь четко доказанные современные данные.

При обосновании модели были использованы результаты, полученные в более простых, но аналогичных с ССИВС по свойствам системах с водородными связями. Так, в работе [10] на основе анализа спин-спиновой структуры сигнала протонов в ЯМР-спектрах было показано, что в димерах карбоновых кислот, например, муравьиной кислоты, перенос протонов происходит кооперативно (синхронно). Процесс сопровождается соответствующим перераспределением электронной плотности. Двойные связи становятся одинарными, а одинарные связи — двойными (схема 5.33):



(5.33)

Аналогичный кооперативный переход, но уже четырех протонов, был зарегистрирован в системах карбоновых кислот, включающих C–OH-группы спирта [11] (схема 5.34):



(5.34)

Данный переход был полностью доказан характерной мультиплетной структурой сигналов.

Другой группой фактов, положенных в основу модели, являются данные о том, что перенос энергии возбуждения ароматических аминокисот триптофана и тирозина на воду при $T = 20$ °C наиболее эффективно происходит в том случае, если они находятся в депротонированном состоянии [12]. Дезактивация возбужденного состояния сопровождается протонированием этих молекул. Это может быть интерпретировано как встречный перенос электрона на воду и переход протона с молекулы воды на

электронодонор. Аналогичные результаты были получены и для других аминокислот [13].

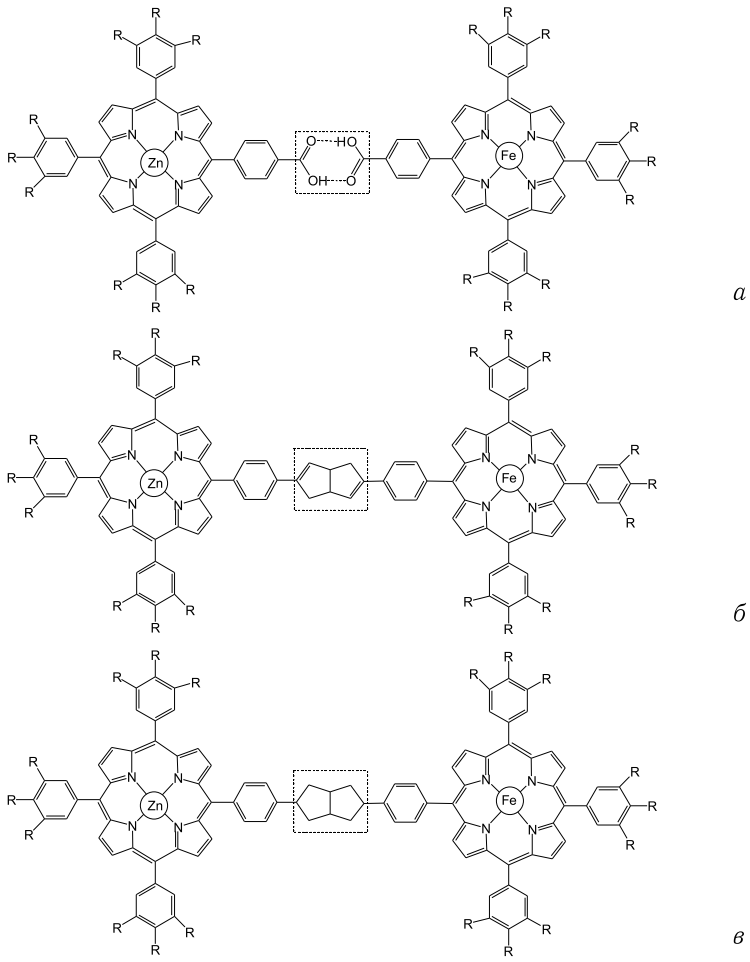


Рис. 5.1. Комплексы порфиринов с атомами Zn и Fe в качестве лигандов, синтезированные для демонстрации переноса электронов (по [14]): *а* — пара комплексов, связанных водородной связью; *б* — комплексы, соединенные через сопряженную систему; *в* — комплексы, изолированные σ-связями. Величины константы ($k_{ET} \times 10^9/s$) составляют, соответственно 8,1, 8,8 и 4,3

Для доказательства переноса зарядов через водородную связь в работе [14] были синтезированы три типа порфириновых соединений, содержащих атомы цинка и железа в качестве донорных и акцепторных центров (рис. 5.1). Одно из них (*а*) представляло собой пару комплексов, связанных водородной связью, в другом (*б*) — порфирины были соединены сопряженной системой, а в третьем (*в*) — изолированы соединением, содержащем σ-связи. Было показано, что величина константы переноса электрона ($k_{ET} \times 10^9/s$) в первом и втором соединениях были одного порядка (8,1 и 8,8), в то время как в третьем — в два раза ниже (4,3). На основании этих

данных авторы работы [14] сделали вывод, что «вопреки общепринятым взглядам, электронное сопряжение, опосредуемое водородными связями, существенно больше, чем опосредуемое σ-связями». Они указывают на кардинальную роль, которую могут играть водородные связи в биологических процессах переноса электронов. Эти данные, полученные сравнительно недавно, также рассматриваются нами в качестве экспериментального основания разработанной нами модели переноса зарядов.

Модель переноса зарядов по ССИВС, описанная в работах [2–5], будет представлена в двух формах — в форме обобщенной схемы и в виде рисунка, с помощью которого удобно анализировать условия реализации модели в надмолекулярных наноструктурах.

5.2.2. Обобщенная схема модели. Предположим, что мы имеем ССИВС, состоящую для простоты только из резонансных групп, с одной стороны которой присоединяется донор заряда (HD), а с другой стороны — акцептор заряда (AH), показанные на схеме 5.35 (начальное состояние 1):

$$H\mathbf{D}^{1+} \rightarrow HQ_1{-}R{=}X_1{...}HQ_2{-}R{=}X_2{...}\ \ {...}HQ_n{-}R{=}X_n{...}H\mathbf{A}^{1} + H^{+}. \qquad (5.35)$$

Рассмотрим процесс переноса заряда по стадиям. На стадии (*а*) донор заряда, имеющий повышенный электрохимический потенциал HD^1 притягивает к себе протон от группы $HQ_1{-}R{=}X_1$, вследствие чего она переходит в состояние $^{--}Q_1{-}R{=}X_1$ (схема 5.36):

$$H\,\mathbf{D}^{1+} \rightarrow HQ_1{-}R{=}X_1{...} \ \rightarrow H^{+} + \mathbf{D}^{1+}H + {}^{-}Q_1{-}R{=}X_1$$

; (5.36)

$$H\,\mathbf{D}^{1+} \rightarrow HQ_1{-}R{=}X_1{...} \ \rightarrow H^{+} + \mathbf{D}^{1+}H + {}^{-}Q_1{-}R{=}X_1$$

при этом донор отдает свой протон в среду. Далее, на стадии (*б*) свободный заряд перемещается с атома $^{-}Q_1$ на X_1 (схема 5.37):

$${}^{-}Q_1{-}R{=}X_1 \rightarrow Q_1{=}R{-}X_1{}^{-}. \qquad (5.37)$$

Появившийся на X_1^{-} отрицательный заряд индуцирует на стадии (*в*) переход протона от группы $HQ_2{-}R{=}X_2$ к группе $Q_1{=}R{-}X_1^{-}$ (схема 5.38):

$$Q_1{=}R{-}X_1{}^{-}{...}HQ_2{-}R{=}X_2 \rightarrow Q_1{=}R{-}X_1H{...}{}^{-}Q_2{-}R{=}X_2\,. \qquad (5.38)$$

Далее все стадии повторяются для группы $...{}^{-}Q_2{-}R{=}X_2$. В результате происходит перенос отрицательного заряда от донора к акцептору, который сопровождается в модели встречным кооперативным сдвигом протонов, выбросом собственного протона донором в среду и, для сохранения электронейтральности, захватом протона акцептором из среды (конечное состояние 1, схема 5.39):

$$H^{+} + \mathbf{D}^{1+}H{...}Q_1{=}R{-}X_1H{...}Q_2{=}R{-}X_2H{...}\ \ {...}Q_n{=}R{-}X_nH \rightarrow \mathbf{A}^{1}H\,. \qquad (5.39)$$

Двойные связи в резонансных группах, как видно из сопоставления схем 5.35 и 5.39, перемещаются при этом в левую сторону от протонов.

Особенностью данного механизма переноса отрицательного заряда, связанного с перемещением протонов в ССИВС, является то, что повторно такой механизм в том же направлении идти не может (протоны уже все переместились). Однако такой процесс, после замены HD^1 на молекулу акцептора HA^2 и HA^1 на молекулу нового донора HD^2 может осуществляться в обратном направлении, справа налево (схемы 5.40 и 5.41).

Начальное состояние 2:

$$H^+ + \mathbf{A^2}H...Q_1{=}R{-}X_1H...Q_2{=}R{-}X_2H... \quad Q_n{=}R{-}X_nH \leftarrow \mathbf{D^2}H\,. \tag{5.40}$$

Конечное состояние 2:

$$H\,\mathbf{A^2} \leftarrow HQ_1{-}R{=}X_1...HQ_2{-}R{=}X_2... \quad ...HQ_n{-}R{=}X_n...H\,\mathbf{D^2} + H^+\,. \tag{5.41}$$

В результате на стадии 4 система пришла к начальному состоянию 1. После повторной замены доноров и акцепторов цикл повторяется (схемы 5.35–5.41).

5.2.3. Роль молекул воды в ССИВС и переносе зарядов. Рассмотрим ССИВС, в которой в качестве одной из групп выступает молекула воды (схема 5.42):

$$H\mathbf{D^{1+}} \rightarrow HQ_1{-}R{=}X_1...\underset{H}{HO}...HQ_2{-}R{=}X_2... \quad ...HQ_n{-}R{=}X_n...H\mathbf{A^1} + H\,. \tag{5.42}$$

Как следует из этой схемы, атом кислорода молекулы воды в сочетании с атомом водорода, встаиваясь в ССИВС, может выступать в качестве аналога атома, принадлежащего к простой группе типа С–ОН. В этом смысле ССИВС, содержащие ОН-группы молекул воды будут близки по своим свойствам системам с участием простых и резонансных групп (схема 5.24). Таким образом, можно ожидать, что одиночные молекулы воды, а точнее, ОН-группы, будут достаточно часто встречаться в составе ССИВС, участвуя в переносе зарядов и не нарушая принципа континуальности ССИВС.

5.2.4. Условия реализации модели в бионических наноструктурах. Для реализации данной модели, наглядно представленной на рис. 5.2 (цветная вклейка) согласно [2–5] необходимо выполнение ряда условий.

1. *Асимметрия расположения протонов в ССИВС.* Все атомы водорода в этих системах должны быть расположены по одну сторону от групп (на рис. 5.2, *а* — все слева), т. е. асимметрично. Для этого ССИВС должны строиться из групп, обладающих противоположными свойствами, протонодоноров и протоноакцепторов. Асимметричное положение протонов является неравновесным и должно поддерживаться постоянной работой этих систем, связанной с попеременной сменой доноров и акцепторов.

2. *Наличие изолирующей среды для функционирования ССИВС.* Для эффективного переноса зарядов структуры, содержащие эти системы, должны обеспечивать их изоляцию от окружающей водной среды, т. е. формировать плотное гидрофобное ядро, в котором проложены ССИВС. На рис. 5.2 эти системы расположены внутри структур.

3. *Возможность эффективной смены доноров и акцепторов зарядов.* Для этого входы и выходы ССИВС должны располагаться в структурах так, чтобы быть доступными для доноров и акцепторов, как это показано на рис. 5.2. Среда, в которой

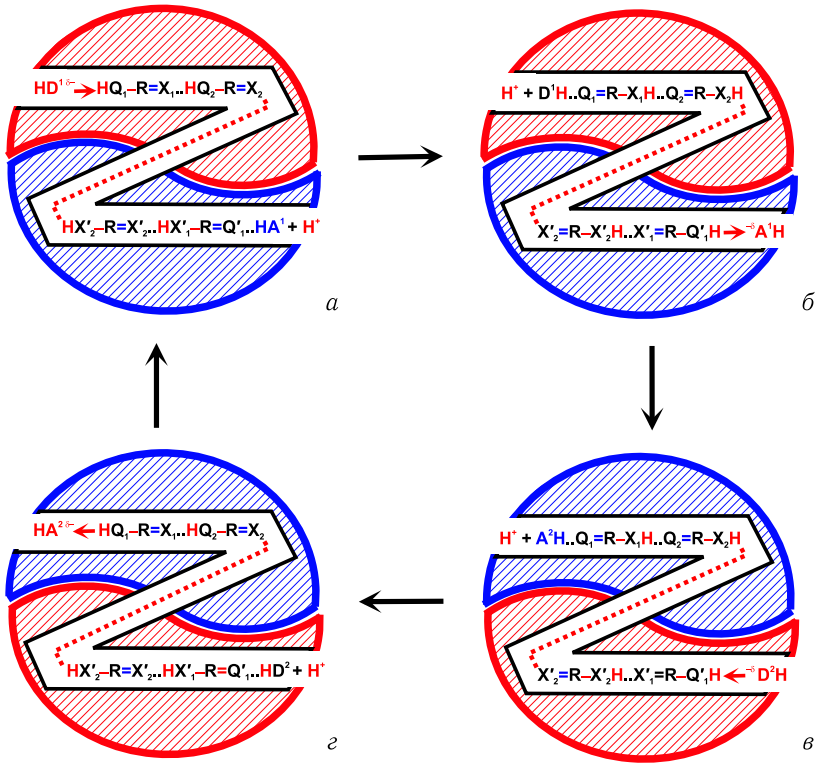


Рис. 5.2. Модель переноса заряда по системам сопряженных ионно-водородных связей (ССИВС): *а*, *в* — начальные состояния; *б*, *г* — конечные состояния

находятся доноры и акцепторы, должна обеспечивать их достаточную подвижность. Идеальной средой для этого является вода.

4. *Термодинамическая обратимость процесса переноса зарядов по ССИВС.* Этому могут способствовать тождественность доноров ($D^1=D^2$) и акцепторов ($A^1=A^2$), участвующих в отдаче и получении зарядов в прямом и обратном направлениях, а также симметрия донорного и акцепторного участков ССИВС.

Симметрия ССИВС может быть создана на основе идентичных субструктур, уложенных симметрично по отношению друг к другу (например, на основе групп симметрии C_{2n}, D_{2n} и т. д.), как минимум, двух, показанных на рис. 5.2. Этот тип симметрии обеспечивается на основе одного механизма синтеза, в результате которого они собираются в симметричные структуры с четным числом субъединиц.

Для идентичности самосборки субъединиц необходимо, чтобы исходные макромолекулы состояли из звеньев, обладающих хиральностью, т. е. имеющих один тип своей стереоконфигурации. В целом это означает, что реализация данной модели требует олигомерной организации структур.

Отметим, что воплощение модели с помощью зеркально симметричных структур является нереальным, поскольку для этого требуется предположить существование двух механизмов синтеза (раздельно для правых и левых хиральных изомеров), ме-

ханизмов сегрегации для правых и левых изомеров, а также специальных устройств для сведения правых и левых структур.

Нами разработан также динамический вариант модели [3], учитывающий факт конфомационной лабильности наноструктур, например, белков-ферментов. Он будет рассмотрен в 10 главе, посвященной модели катализа, где этот вариант будет использоваться.

Следствие модели. Поскольку модель для своей реализации требует использования обоих направлений ССИВС, то ее следствием должно быть поочередное функционирование субъединиц, входящих в олигомер, что показано на рис. 5.2 штриховкой.

Перечисленные условия полностью реализованы в биоструктурах [2, 3]. Более того, предсказываемый на основе модели колебательный режим функционирования наноструктур, реализуется во многих биоструктурах. Например, для описания работы многих ферментов подходит модель поочередного включения активных центров [15] (мультивибраторная модель). Аналогичная модель применяется при описании работы репрессоров ДНК [16–18], биорецепторов [20, 21] и т. д. Это позволило сформулировать второй основной принцип концепции ССИВС: перенос зарядов (энергии) в надмолекулярных структурах должен осуществляться по ССИВС через водородную связь [2–5]. Кратко его можно обозначить как принцип сопряжения через водородную связь для переноса энергии в надмолекулярных структурах.

Таким образом, бионические надмолекулярные наноструктуры, с точки зрения концепции ССИВС, должны содержать в структуре непрерывные линии ССИВС, состоять, как правило, из четного числа идентичных субъединиц и формироваться из линейных цепей, состоящих из однотипных хиральных модулей и способных к самоорганизации.

5.2.5. Сопоставление модели с современными концепциями биоэнергетики. По сравнению состоянием проблемы переноса зарядов, существовавшей 20 лет назад, на момент написания монографии [2], ситуация, сложившаяся на настоящий момент существенно упростилась. По существу, лишь два направления остались ведущими в биоэнергетике (в широком смысле слова): хемиосмотичекая теория (см. раздел 4.1.1) и группа походов, изучающая дальний перенос электронов (раздел 4.1.2). Мы уже проводили критический анализ этих походов с точки зрения возможности их использования для целей конструирования бионических наноструктур (раздел 4.2.6). Не будем их здесь повторять. Отметим лишь следующее.

Отсутствие в хемиосмотичекой теории представлений о молекулярных механизмах переноса электронов и протонов привело к тому, что, несмотря на огромную информацию о структуре белков, участвующих в цепи переноса зарядов, авторы не могут использовать эту информацию, либо используют лишь в незначительной степени. Мы не претендуем в данный момент на детальное рассмотрение и объяснение всех механизмов, имеющих место в цепи переноса зарядов (некоторые из путей переноса электронов будут показаны в гл. 11). В качестве общего соображения, мы полагаем, что возникновение градиентов концентрации протонов и определенной структурно-функциональной организации в электронно-транспортной цепи является естественным следствием предложенного выше механизма переноса зарядов по ССИВС.

В то же время, механизм переноса зарядов, предполагающий туннелирование электронов по любым связям, в значительной степени лишает биоструктуры той специфичности, которая им свойственна в каждом конкретном случае. Для чего существует определенная структурно-функциональная организация и что делает та или иная аминокислота из канонического набора в той или иной структуре, это для туннельного механизма не имеет существенного значения. Такие понятия как «вход», «выход», «задержка» сигнала и другие на базе туннельного механизма, по крайней мере, на данный момент, не были построены. Мы полагаем, что это не случайно, а для этого существуют определенные объективные причины. В то же время, как мы увидим в последующих главах, с позиции механизма переноса зарядов по ССИВС биологические молекулы легко выделяются в качестве функциональных модулей.

Следует также отметить, что в рамках обоих походов такой вопрос, как природа субъединичного строения биоструктур даже не рассматривается, а уж тем более не объясняется. В то же время, в рамках предложенного нами механизма переноса зарядов по ССИВС существование субъединиц и поочередность их функционирования не только объясняется, но и является необходимым условием его реализации.

Особо обсудим механизм переноса зарядов, развитый в рамках теории цепей перераспределения связей (ЦПС) (раздел 4.2.5). Принципиально этот механизм очень близок к модели, которая используется нами. Однако в рамках теории ЦПС не выделены элементарные понятия простой и резонансной группы, не построена классификация групп, встречающихся в биомолекулах и биоструктурах. Это не позволило в рамках теории ЦПС конструировать формальные ССИВС и переходить от них к конкретным надмолекулярным комплексам. Кроме того, отсутствие этих элементарных понятий оказалось препятствием к тому, чтобы предложить обобщенную модель переноса зарядов и проанализировать условия ее реализации в биоструктурах.

В последующих главах этой книги будет показана продуктивность предложенной концепции ССИВС к анализу надмолекулярных биоструктур и для последующего конструирования бионических наноструктур.

Литература к главе 5

1. *Карасев В.А.* О роли систем сопряженных ионно-водородных связей в надмолекулярных структурах // Вестник Ленингр. ун-та. 1974. № 9. С. 74–86.
2. *Карасев В.А.*, *Стефанов В.Е.*, *Курганов Б.И.* Надмолекулярные биоструктуры: организация, функционирование, происхождение // В кн.: Итоги науки и техники. Сер. Биол. химия. Т. 31. — М.: ВИНИТИ, 1989. — 199 с.
3. *Карасев В.А.*, *Стефанов В.Е.* Эволюционный структурно-функциональный подход к надмолекулярным структурам // Успехи биол. хим. — М.: Наука, 1991. Т. 32. С. 114–145.
4. *Карасев В.А.*, *Лучинин В.В.*, *Стефанов В.Е.* Как построить биочип // Биотехнология. 1993. № 2. С. 3–15.
5. *Karasev V.A.*, *Luchinin V.V.*, *Stefanov V.E.* A Model of Molecular Electronics Based on the Concept of Conjugated Ionic-Hydrogen Bond Systems // Adv. Mater. Opt. Electron. 1994. V. 4. P. 203–218.
6. *Pauling L.* The Nature of the Chemical Bond / 3rd ed. Ithaca. — N. Y.: Cornell Univ. Press, 1960. — 644 p.
7. *McArdle L.*, *Bergin O.*, *Fallowfield M.E.*, *Dervan P.A.*, *Easty D.J.* Tyrosine phosphate in melanoma progression // Br. J. Dermatol. 2003. V. 149, № 2. P. 289–295.
8. *Шигорин Д.Н.* Водородная связь в системах с π-электронами // В кн. Водородная связь / Под ред. Н.Д. Соколова, В.М. Чулановского. — М.: Наука, 1964. С. 195–219.
9. *Финкельштейн А.В.*, *Птицын О.Б.* Физика белка. — М.: Книжный дом «Университет», 2002. — 376 с.
10. *Golubev N.S.*, *Denisov G.S.*, *Koltsov A.I.* Proton spin-spin coupling in complexes of formic acids with proton acceptor // J. Mol. Sruct. 1981. V. 75. P. 333–337.
11. *Golubev N.S.*, *Denisov G.S.*, *Pushkareva E.G.* Structure of the complexes of formic acid with butanol // J. Mol. Liquids. 1983. V. 26. P. 169–176.
12. *Бурштейн Э.А.*, *Бусел Е.П.* Деактивация возбужденного состояния индола и его производных в водных растворах. Люминасцнция триптофана в щелочной среде при комнатной температуре // Оптика и спектроскопия. 1970. Т. 29. С. 1087–1093.
13. *Бурштейн Э.А.* Люминесценция бековых хромофоров (модельные исследования // В кн.: Итоги науки и техники. Сер. Биофизика. Т. 6. — М.: ВИНИТИ, 1976. С. 3–213.
14. *de Rege P.J.*, *Williams S.A.*, *Therien M.J.* Direct evaluation of electronic coupling mediated by hydrogen bonds: implications for biological electron transfer // Science. 1995. V. 269. 1409–1413.
15. *Карасев В.А.*, *Стефанов В.Е.* «Флип-флоп»-механизм в ферментативном катализе: гипотеза универсальности // Успехи соврем. биологии. 1989. Т. 108. С. 235–249.
16. *Wijgerde M.*, *Grosveld F.*, *Fraser P.* Transcription complex stability and chromatin dynamics in vivo // Nature. 1995. V. 377. P. 209–213.
17. *Lawson C.L.*, *Carey J.* Tandem binding in crystals of a trp repressor / operator half-site complex // Nature. 1993. V. 366. P. 178–182.
18. *Bandyopadhyay S.*, *Deb S.*, *Bose S.*, *Roy S.* Half-of-the-sites reactivity of F235C lambda-repressor: implications for the structure of the whole repressor // Protein Eng. 2002. V. 15. P. 393–401.

19. *Gewirth D.T.*, *Sigler P.B.* The basis for half-site specificity explored through a non-cognate steroid receptor-dna complex // Nat. Struct. Biol. 1995. V. 2. P. 386–394.
20. *Demoliou-Mason C.D.*, *Barnard E.A.* Distinct subtypes of the opioid receptor with allosteric interactions in brain membranes // J. Neurochem. 1986. V. 46. P. 1118–28.
21. *Biemann H.P.*, *Koshland D.E. Jr.* Aspartate receptors of Escherichia coli and Salmonella typhimurium bind ligand with negative and half-of-the-sites cooperativity // Biochemistry. 1994. V. 33. P. 629–634.

Глава 6

БИОСТРУКТУРЫ И БИОМОЛЕКУЛЫ В РАМКАХ КОНЦЕПЦИИ ССИВС

6.1. Базовая архитектура бионических наноструктур

6.1.1. Следствия механизма переноса зарядов по ССИВС. Биологические структуры, как мы уже упоминали, рассматриваются нами как частный случай бионических наноструктур. Из предложенной нами модели переноса зарядов возникает ряд следствий:

— водородной связи можно придать функцию «контакта» между звеньями цепи коммутации или модулями;

— за вход в звено или модуль можно принять атом водорода, а за выход — неподеленную пару электронов, т. е. $\rightarrow$ HQ–R=X: $\rightarrow$;

— процесс переноса заряда можно обозначать термином «сигнал».

Описанные следствия приводят к принципиально новым взглядам на биоструктуры и биомолекулы. Мы сосредоточим внимание, на белках, нуклеиновых кислотах и липидах и элементах этих макромолекул. Аналогично можно осуществить ее применение и к другим биоструктурам.

6.1.2. Белки. В работах [1–4] было показано, что в белках можно выделить базовую архитектуру и базовые элементы. Типовыми конструкциями белков являются листовые структуры и спирали [5–7]. Элементом, участвующим в образовании этих конструкций является HN–C=O-группа. На рис. 6.1 приведены фрагменты основных типов листовых структур — параллельная и антипараллельная β-структуры, формирующиеся из растянутых конформаций полипептидной цепи и наиболее известные типы спиралей — спираль 3_{10} и α-спираль. Как видно на рисунках 6.1, *а* и 6.1, *б*, в листовых структурах наблюдается чередование направлений систем HN–C=O-групп, что можно трактовать как попеременное расположение входов и выходов.

По аналогии с техническими устройствами, эти структуры напоминают многожильный электрический шланг. В белках они часто встречаются в области контакта субъединиц. Например, в конканавалине А, белке, содержащем преимущественно β-структуру, такие ССИВС переходят из одной субъединицы в другую (файл 5CNA из Protein Data Bank) [8].

Если водородные связи возникают в белковой цепи между группами $\overset{i-2}{\text{HN}}\text{–}\overset{i-3}{\text{C}}\text{=O}\ldots$ $\ldots\overset{i}{\text{HN}}\text{–}\overset{i-1}{\text{C}}\text{=O}$, где i — порядковый номер аминокислотного остатка в полипептидной цепи, участвующего в образовании водородной связи, то возникает спираль 3_{10} (рис. 6.1 *в*), в которой проходят две параллельно идущие системы HN–C=O-групп, имеющие одинаковое направление. Эти системы, как видно на рисунке, изолированы друг от друга α-углеродными атомами.

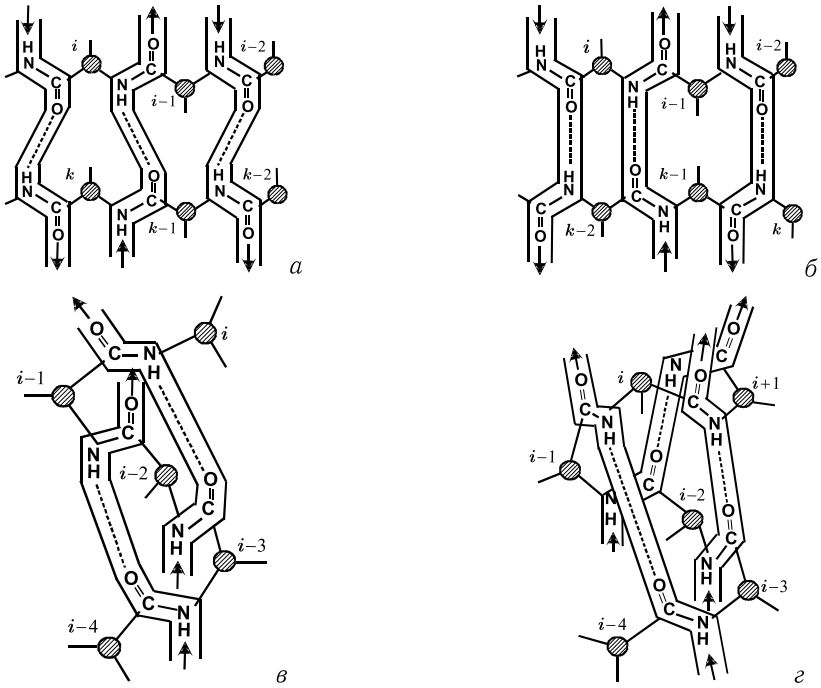


Рис. 6.1. Базовая архитектура белковых структур: *а*, *б* — листовые структуры; *в*, *г* — спиральные структуры

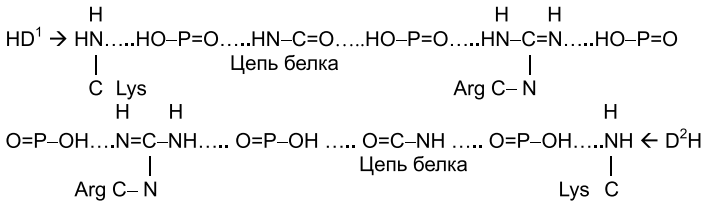
При взаимодействии групп $\overset{i-3}{\text{HN}}\text{–}\overset{i-4}{\text{C}}\text{=O}\ldots\overset{i}{\text{HN}}\text{–}\overset{i-1}{\text{C}}\text{=O}$, образуется α-спираль, и возникают три параллельных системы HN–C=O-групп, (рис. 6.1, *г*).

Таким образом, с точки зрения использования их в качестве структурного элемента наноэлектроники, данные системы являются идеальным вариантом для создания своеобразной «шины данных». В реальных белках рассмотренные базовые конструкции никогда не бывают изолированными и обычно соединяют функциональные домены из аминокислот, а также отдельные аминокислоты, не являющиеся близкими соседями в полипептидной цепи. Это является лишним подтверждением функциональной значимости ССИВС в механизмах переноса зарядов.

6.1.3. Нуклеиновые кислоты. Нуклеиновые кислоты (НК) состоят из нуклеотидов, содержащих азотистое основания и рибозу (в РНК) или дезоксирибозу (в ДНК), соединенных HO–P=O-группами. Если следовать аналогии с белками, то в принципе, можно представить себе структуры, подобные приведенным на рис. 6.1, в которых в качестве боковых цепей выступают азотистые основания или другие органические остатки, а вместо HN–C=O-групп — HO–P=O-группы. Такая возможность интересна для наноэлектроники, поскольку системы, состоящие только из HO–P=O-групп должны иметь совершенно иные энергетические параметры, чем из HN–C=O-групп [9, 10].

В биологии, такие системы нем не известны. Однако, HO–P=O-группы, регулярно расположенные на остове НК, могут быть основой для комплексов с участием C–NH, HN–C=N, групп аминокислот Lys и Arg и других боковых цепей, а также HN–

C=O-групп основной цепи белка, например (схема 6.1):



(6.1)

В силу противоположной направленности (антипараллельности) цепей НК, например ДНК, такие ССИВС должны обладать симметрией C_2 и противоположное направление переноса заряда. Возможность возникновения подобных систем предполагалась нами в работах [2–4]. В настоящее время они обнаружены во многих комплексах белков с НК. Конкретные примеры будут рассмотрены в гл. 7.

6.1.4. Фосфолипиды. Молекулы фосфолипидов, важных элементов, входящих состав биомембраных комплексов, занимают промежуточное положение между биологическими макромолекулами и биомолекулами. Поэтому они могут рассматриваться и как основа базовой архитектуры биомембран, куда входят эти липиды, и как функциональные модули.

Полярные группы фосфолипидов могуть служить основой для формирования трех зон ССИВС (табл. 6.1.): C–NH-группы азотистого основания (фосфатидилэтаноламина — ФЭА), HO–P=O-группы, связывающей, как мы упоминали, азотистое основание с диглицеридным остатком ФЭА и фосфатидилхолина (ФХ), O–C=O-группы, через которые жирные кислоты связываются с глицерином фосфолипида. При этом, если ФЭА может участвовать в формировании ССИВС как C–NH, так и HO–P=O-группой, то ФХ, из-за наличия метильных групп в холиновом основании, только HO–P=O-группой. Таким образом, с позиции концепции ССИВС можно ожидать обнаружение в структуре биомембран многочисленных ССИВС. Это предсказание нашей концепции [1–4] подтвердилось при исследовании структуры биомембран, о чем будет рассказано в гл. 11.

6.1.5. Перспективы для наноэлектроники. Приведенные примеры групп, используемых в биоструктурах в качестве элементов базовой архитектуры, позволяет поставить вопрос: а какие еще группы можно использовать для построения базовой архитектуры? Если обратиться к таблице групп (табл. 5.1.), то на ее основе можно предложить еще ряд полимеров, потенциально способных к формированию ССИВС (табл. 6.2.) [9, 10].

Как видно из этой таблицы, помимо белков и НК возможно предложить не так уж много новых цепных полимеров. Например, кажутся интересными полимеры на основе полиимидазолов, а также содержащие в качестве центрального атома серу и кремний. Перспективность их использования в наноэлектронике будет определяться как условиями, в которых они являются стабильными, так и сферой возможного применения.

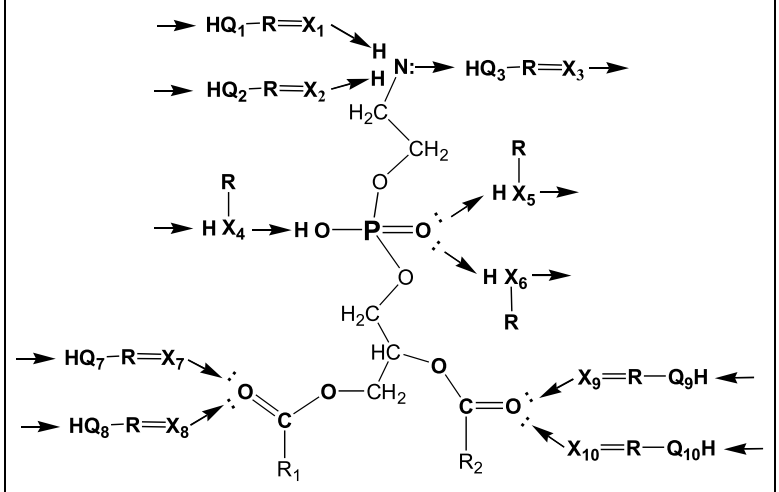
6.2. Базовые элементы

Функционально полный набор базовых элементов предполагает наличие в их составе таких элементов, которые могли бы выполнять функцию элементов ИЛИ,

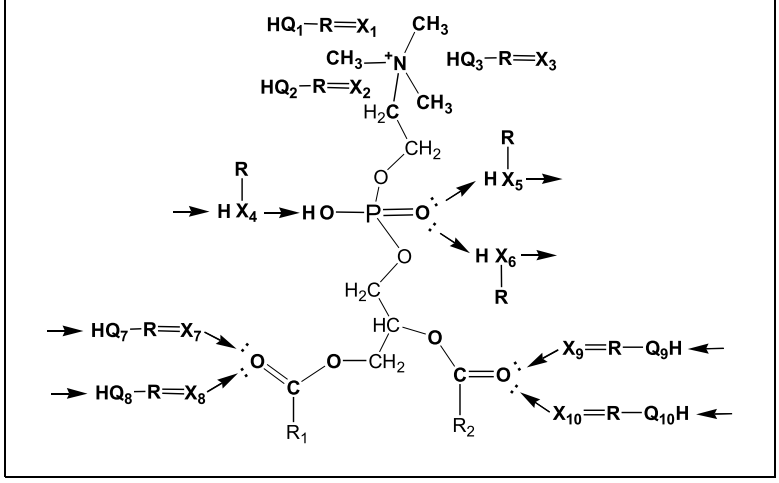
Таблица 6.1

Молекулы фосфолипидов в составе ССИВС

Фосфатидилэтаноламин (ФЭА)



Фосфатидилхолин (ФХ)



НЕ либо И, НЕ. Рассмотрим возможности использования белковых структур и отдельных их звеньев в для построения такого набора базовых элементов.

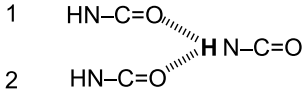
6.2.1. Вилочковая водородная связь как потенциальный узел для создания элемента ИЛИ. В структуре белков системы HN–C=O-групп, рассмотренные в разделе 6.1.2.1, не всегда идеально линейны. Очень часто наблюдаются ветвления

Таблица 6.2

Полимеры, потенциально способные к формированию ССИВС, предлагаемые для наноэлектроники

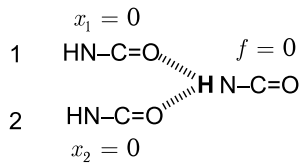
Полимер	ССИВС
Полипептиды и белки	... HN–C=O ... HN–C=O ... HN–C=O ...
Тиополипептиды	... HN–C=S ... HN–C=S ... HN–C=S ...
Поли(ацетонитрил-метиламин)	... HN–C=N ... HN–C=N ... HN–C=N ... CH_3 CH_3 CH_3
Полиимидазолы	... HN–C=N ... HN–C=N ... HN–C=N ...
Нуклеиновые кислоты (НК)	... HO–P=O ... HO–P=O ... HO–P=O ...
Аминофосфатный аналог НК	... HN–P=O ... HN–P=O ... HN–P=O ...
Аминосульфатный аналог НК	... HN–S=O ... HN–S=O ... HN–S=O ...
Аминосиликат-ный аналог НК	... HN–Si=O ... HN–Si=O ... HN–Si=O ...

таких систем с участием вилочковых водородных связей (схема 6.2):



(6.2)

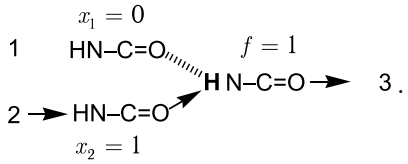
Этот факт был использован нами при построении молекулярного модуля, близкого по своей функции к элементу ИЛИ [11, 12]. Атом водорода в такой связи одновременно связан с HN–C=O-группами системы 1 и системы 2. Допустим, что ни в системе 1, ни в системе 2 сигнала нет (схема 6.3):



(6.3)

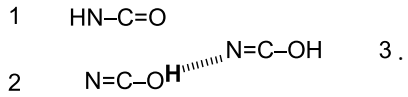
Значения переменных: $x_1 = 0$, $x_2 = 0$, $f = 0$ (сигнала на выходе в систему 3 нет). Предположим теперь, что сигнал появился в системе 2 и он может направиться

только в систему 3 (схема 6.4):



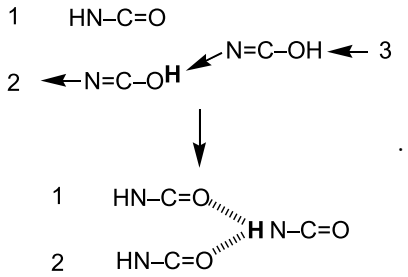
(6.4)

Состояния систем будут описываться следующими переменными: $x_1 = 0$, $x_2 = 1$, функция системы $f = 1$. После прохождения сигнала система придет в следующее состояние (схема 6.5):



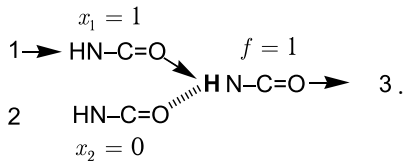
(6.5)

Учитывая поочередный механизм переноса заряда по ССИВС, принятый в нашей модели, спустя какое-то время сигнал из системы 3 возвращает весь узел в исходное состояние (схема 6.6):



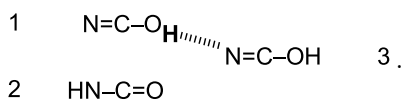
(6.6)

После этого, если появится сигнал в системе 1, то вид узла будет таким (схема 6.7):



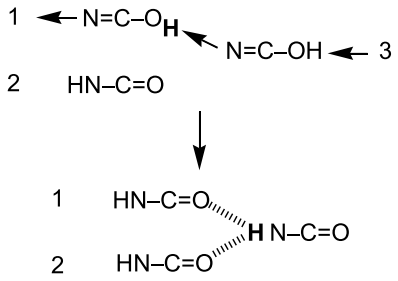
(6.7)

При этом $x_1 = 1$, $x_2 = 0$, $f = 1$. Система переходит в состояние (схема 6.8):



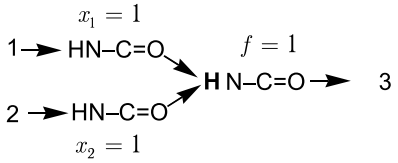
(6.8)

Далее, аналогично схеме 5.6, снова возврат в исходное состояние (схема 6.9):



(6.9)

Для перехода из исходного состояния есть еще один вариант (схема 6.10):



(6.10)

В этом случае оба сигнала пройти не могут, поскольку атом водорода должен переместиться, согласно модели, либо к HN–C=O-группе системы 1, либо к такой же группе системы 2, однако прохождение любого из этих сигналов приводит к появлению сигнала в системе 3. С оговорками, можно записать: $x_1 = 1$, $x_2 = 1$, $f = 1$. Строим таблицу состояний переменных (схема 6.11):

x_1	x_2	f
0	0	0
0	1	1
1	0	1
1	1	1?

(6.11)

За исключением последней, проблематичной, строки, она совпадает с таблицей для дизъюнкции. Поэтому этот узел можно рассматривать как близкий аналог элемента ИЛИ [11].

Таким образом, мы показали, что узел с вилочковой водородной связью может быть важным логическим элементом, — аналогом элемента ИЛИ. Кроме систем с участием HN–C=O-групп, вилочковая водородная связь наблюдается и для многих боковых цепей аминокислот, что будет отмечено в дальнейшем анализе базовых элементов.

6.2.2. Аминокислоты. В составе аминокислот нами были выделены пассивные и активные элементы [1–4]. Роль пассивных элементов, боковых цепей аминокислот, не способных к образованию водородных связей (аланин, валин, лейцин, изолейцин и фенилаланин), состоит в создании изолирующей неполярной среды для ССИВС. Активные элементы — это аминокислоты, полярные группы которых могут встраиваться в ССИВС. С позиции микроэлектроники боковые цепи, создающие среду для ССИВС (пассивные элементы), можно рассматривать как множество маскирующих

элементов, а участвующие в формировании ССИВС (активные элементы) — как «окна» [12].

В зависимости от возможной молекулярной функции в составе ССИВС активные элементы были разделены на ряд групп [1–4] (табл. 6.3).

1. Инициаторы ССИВС: пролин (Pro), метионин (Met).

2. Молекулярные клапаны: серин (Ser), треонин (Thr), аспарагиновая кислота (Asp), глютаминовая кислота (Glu), аспрагин (Asn), глютамин (Glu), лизин (Lys), аргинин (Arg).

3. Элементы задержки сигнала: гистидин (His), тирозин (Tyr).

4. Элементы инверсии сигнала: триптофан (Trp), тирозин (Tyr).

Рассмотрим аминокислоты, приведенные в этой таблице, более подробно, используя при этом, как и выше, термины «сигнал», «вход» и «выход».

1. *Элементы инициации.* К таким элементам мы отнесли аминокислоты Pro и Met. Обычно именно с Pro начинается формирование α-спиральных фрагментов в белках, поскольку атом азота его N–C=O-группы встроен в пятичленный цикл. Атом серы Met с двумя парами неподеленных электронов также может служить местом прикрепления ССИВС. Не случайно, вероятно, что именно с Met начинается синтез всех белков [13].

2. *Молекулярные клапаны.* Аминокислоты, отнесенные к этой группе, подразделяются на две подгруппы:

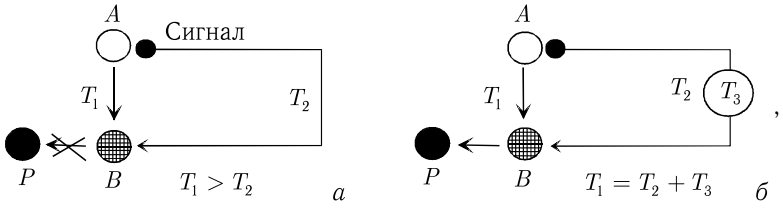
а) *элементы, имеющие 1 вход — два и более выходов* (Ser, Thr с простой группой C–OH и Asp, Glu с резонансной HO–C=O-группой). Как видно в таблице, они могут использовать не все возможные выходы (вторая строка в этой подгруппе), а также образовывать вилочковые водородные связи (третья строка), т. е. функционировать как аналог элемента ИЛИ;

б) *элементы, имеющие 2 входа — 2 и более выходов* (Asn, Gln с HN–C=O-группой, Lys — с простой C–NH_2-группой и Arg — с резонансными HN–C=N-группами). Особенностью этих элементов является возможность их модификации, например, путем метилирования (третья строка в этой подгруппе). Число возможных входов при этом уменьшается.

3. *Элементы задержки сигнала.* К ним отнесены боковые цепи аминокислот, имеющих 1 вход — 1 выход (His и Tyr). Необходимость в элементах задержки появляется в том случае, когда должны быть согласованы во времени два и более параллельных процесса [1, 11].

Предположим, что вещество A за время T_1 превращается в вещество B. Для того, чтобы далее вещество B превратилось в продукт P необходимо, чтобы в нужный момент был подан сигнал по расположенной рядом системе.

Если время прохождения сигнала по системе T_2 меньше, чем время превращения A в B, как это показано на схеме 6.12, *а*:



(6.12)

Таблица 6.3

Полярные аминокислоты как функциональные элементы систем сопряженных ионно-водородных связей

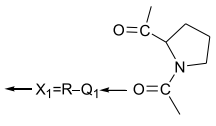
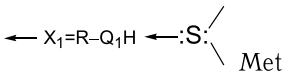
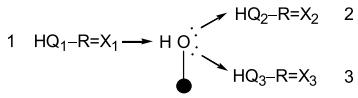
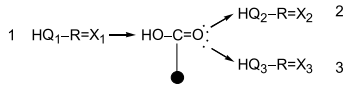
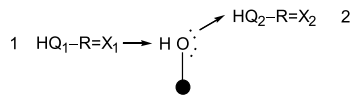
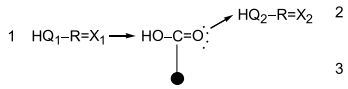
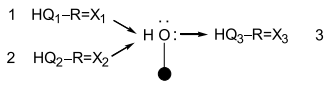
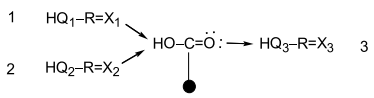
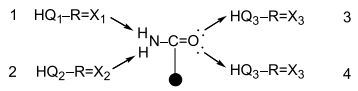
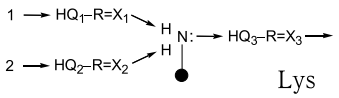
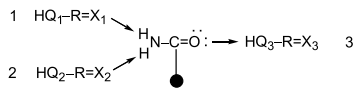
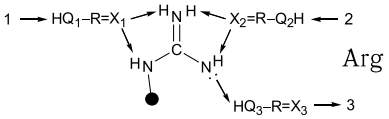
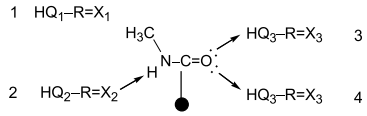
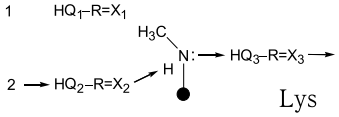
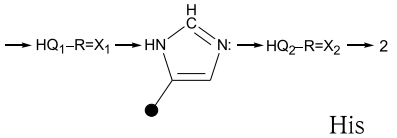
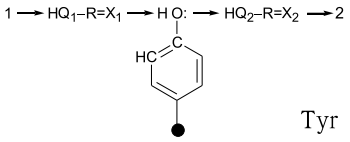
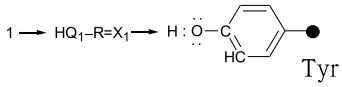
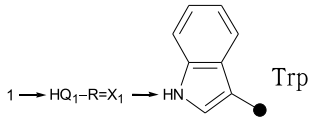
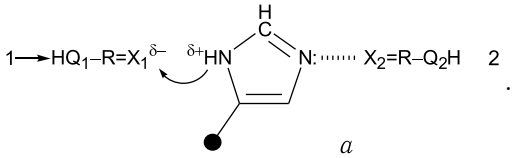
Элементы инициации (0 входов — 1 выход)	
 Pro	 Met
Молекулярные клапаны	
1 вход — 2 выхода	
Ser, Thr	Asp, Glu
	
	
	
Два и более входов — один и более выходов	
Asn, Gln	Lys, Arg
	
	
Asn, Gln	Lys
	

Таблица 6.2 (*окончание*)

Элементы задержки сигнала (1 вход — 1 выход)	
His	Tyr
 His	 Tyr
Элементы инверсии сигнала (1 вход-выход)	
Tyr	Trp
 Tyr	 Trp

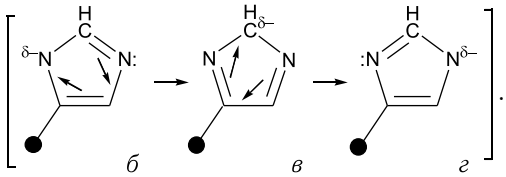
то в результате молекула A не успевает перейти в молекулу B, энергия сигнала расходуется неэффективно и продукт P не образуется. Если теперь ввести в систему элемент с одним входом — одним выходом, прохождение через который увеличивает время движения сигнала по системе на время T_3 (схема 6.12, *б*), то при $T_1 = T_2 + T_3$ сигнал придет вовремя и продукт P образуется. Таким образом, введение элементов задержки позволяет обеспечить синхронизацию ранее не согласованных процессов, что приобретает особую важность в процессах катализа (см. гл. 10).

Приведем в качестве примера работу гистидина в роли элемента задержки [11]. Его имидазольное кольцо имеет один вход — один выход,. На стадии *а* (схема 6.13) пришедший из системы 1 сигнал (заряд δ–) индуцирует притяжение протона:



а . (6.13)

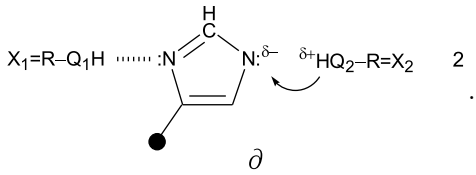
В результате происходит отрыв протона и переход его к атому X_1. На атоме азота образуется заряд (δ–), который на стадиях *б–г* (схема 6.14) перемещается внутри цикла, одновременно с перераспределением расположения двойных связей (показаны стрелками):



б *в* *г* . (6.14)

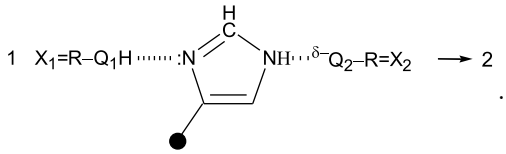
Процесс происходит до тех пор, пока заряд не перейдет на второй атом азота $N^{\delta-}$. На стадии *д* (схема 6.15) этот заряд индуцирует притяжение атома водорода от

группы $HQ_2–R=X_2$ системы 2:



д (6.15)

Наконец, на стадии *е* атом водорода переходит к атому азота, а заряд — на атом Q_2 и сигнал направляется далее по системе 2 (схема 6.16):

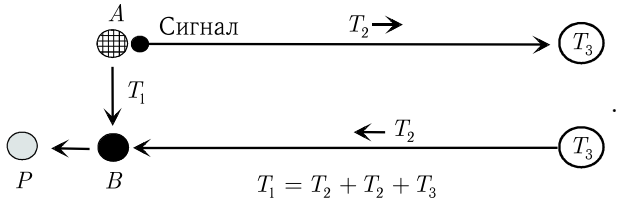


е (6.16)

Таким образом, прохождение сигнала, благодаря электронной системе His, задержалось на три стадии.

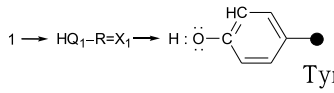
Аминокислота Tyr также может рассматриваться в качестве элемента задержки сигнала. Однако, в отличие от His, тирозин включен в цепь не целиком всем циклом, а лишь своей C=C–OH-группой, т. е. не последовательно, а параллельно цепи. Атом водорода, связанный с этой группой, образует водородную связь с группой $HQ_1–R=X_1$ системы 1, а неподеленная пара электронов, принадлежащая кислороду — с группой $HQ_2–R=X_2$ системы 2.

4. *Элементы инверсии сигнала.* К этим элементам мы отнесли боковые цепи Tyr и Trp, которые могут иметь 1 вход-выход. Необходимость появления таких элементов диктуется из следующих соображений [1, 11]. Предположим, что молекула A начала претерпевать изменения и от нее появился сигнал, который направился в систему с элементом инверсии на конце (схема 6.17):



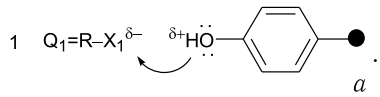
(6.17)

За время T_2 сигнал доходит до элемента инверсии и какое-то время T_3 может находиться в этом элементе, а затем снова возвращается к молекуле, перешедшей за это время в состояние B. Если время T_1 перехода $A \to B$ равно сумме $T_2 + T_2 + T_3$ то пришедший из системы сигнал сможет вовремя перевести молекулу из состояния B в продукт P. Таким образом, элементы инверсии, как и элементы задержки, могут обеспечить на временное согласование различных процессов. С этих позиций была рассмотрена аминокислота тирозин [11] (схема 6.18):



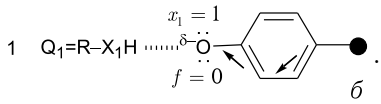
(6.18)

Как и ранее, на стадии *а* сигнал, появившийся на X_1 в виде заряда (схема 6.19), индуцирует притяжение атом водорода к группе $Q_1–R=X_1$:



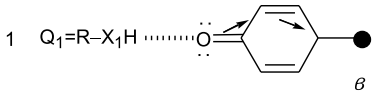
(6.19)

Далее, на стадии *б* (схема 6.20) происходит миграция заряда и одновременное перемещение двойных связей:



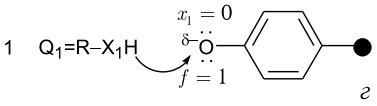
(6.20)

При этом сигнал вошел в систему ($x_1 = 1$) а на выходе из системы нет сигнала ($f = 0$). На стадии *в* (схема 6.21) снова происходит перемещение двойных связей:



(6.21)

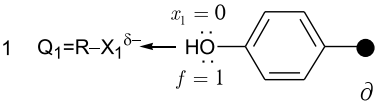
Система тирозина возвращается к состоянию, похожему на исходное, но с несколько иным расположением двойных связей (схема 6.22, стадия *г*):



(6.22)

На входе сигнала не было ($x_1 = 0$), а на выходе системы появляется сигнал ($f = 1$), индуцирующий притяжение протона от X_1 к атому кислорода.

На последней стадии *д* сигнал возвращается в систему 1, но с обратным знаком (схема 6.23):



(6.23)

Выпишем таблицу состояний для тирозина (схема 6.24):

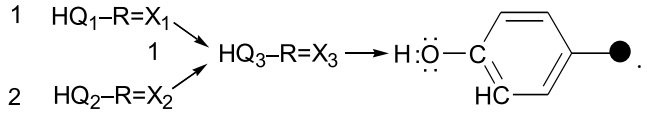
x_1	f
1	0
0	1

(6.24)

Если сопоставить эту схему с таблицей состояний элемента НЕ, то ясно, что тирозин ведет себя аналогично. Таким образом, Туг можно рассматривать как элемент НЕ. Точно так же можно рассмотреть аминокислоту триптофан.

В сочетании с рассмотренным выше узлом ИЛИ, основанным на вилочковой водородной связи, с помощью этих аминокислот можно построить простейший муль-

тивибратор [11] (схема 6.25):



(6.25)

Сигнал, подаваемый поочередно из систем 1 и 2 будет так же поочередно, с помощью тирозина, возвращаться обратно, обеспечивая временную последовательность каких–либо молекулярных событий.

6.2.3. Работа аминокислот в составе ССИВС олигомерных структур. Следует принять во внимание, что структуры, содержащие ССИВС, являются олигомерными. Это накладывает определенные особенности на работу отдельных аминокислот в составе ССИВС. В работах [3, 4] в качестве примера был рассмотрен механизм функционирования HN–C=O-группы Asn в составе структуры, состоящей из двух субъединиц (димера). Мы рассмотрим эту структуру (рис. 6.2.), используя, для простоты вариант Asn с двумя входами — одним выходом (табл. 6.3.).

Предположим, что на стадии *а* сигнал от донора HD^1, (молекулы АТФ), передается на группу $HQ_1–R=X_1$. Далее он попадает на HN–C=O-группу Asn 1 и группу $HQ_3–R=X_3$, находящуюся на выходе HN–C=O-группы. Далее, по ССИВС димера сигнал передается на HN–C=O-группу Asn 2, находящуюся в ином, чем Asn 1 состоянии. Через группы $HQ'_1–R=X'_1$ и $HX'_2–R=Q'_2$ сигнал направляется к центру симметрии димера. В результате димер переходит в стадию *б*, на которой, как можно убедиться, Asn 1 и Asn 2 находятся в одинаковом состоянии.

Затем процесс переноса заряда происходит через группы HN–C=O молекул Asn 1 и Asn 2 вплоть до акцептора заряда HA^1. После замены HA^1 на новую молекулу донора, например HD^2, димер переходит в стадию *в*, являющуюся симметричной стадии *а*. При этом состояния HN–C=O-групп в димере как бы поменялись местами.

Дальнейший процесс идет через стадию *г*, на которой Asn 1 и Asn 2 напходятся в одинаковом состоянии. Цикл завершается переходом димера на стадию *а*, симметричную стадии *в*. Таким образом, цикл состояний Asn в составе ССИВС характеризуется двумя асимметричными состояниями (на стадиях *а* и *в*) и двумя симметричными (а по сути, неразличимыми) состяниями (стадии *б* и *г*). Этот анализ будет использован в разделах, посвященных проблемам катализа и молекулярного узнавания (гл. 9 и 10).

Согласно современным данным, любая логическая схема в микроэлектронике может быть реализована фактически с помощью двух типов логических элементов из функционально полного набора: И-НЕ либо ИЛИ-НЕ. Чтобы набор аминокислот мог реализовать логические схемы микроэлектроники, в нем должны присутствовать вышеназванные логические элементы. Анализ табл. 6.3 показал, что в этом наборе присутствуют аналоги таких элементов. Дальнейшее развитие этой идеи будет продолжено в гл. 8.

6.2.4. Азотистые основания. Анализ азотистых оснований в качестве элементов ССИВС был необходим для дальнейшего прояснения роли этих биомолекул в НК [1–4], в составе нуклеотидов и кофакторов многих ферментов.

В табл. 6.4 показаны четыре азотистых основания (аденин — A, урацил — U, гуанин — G, цитозин — C) в составе ССИВС. Как следует из табл. 6.4, эти молекулы

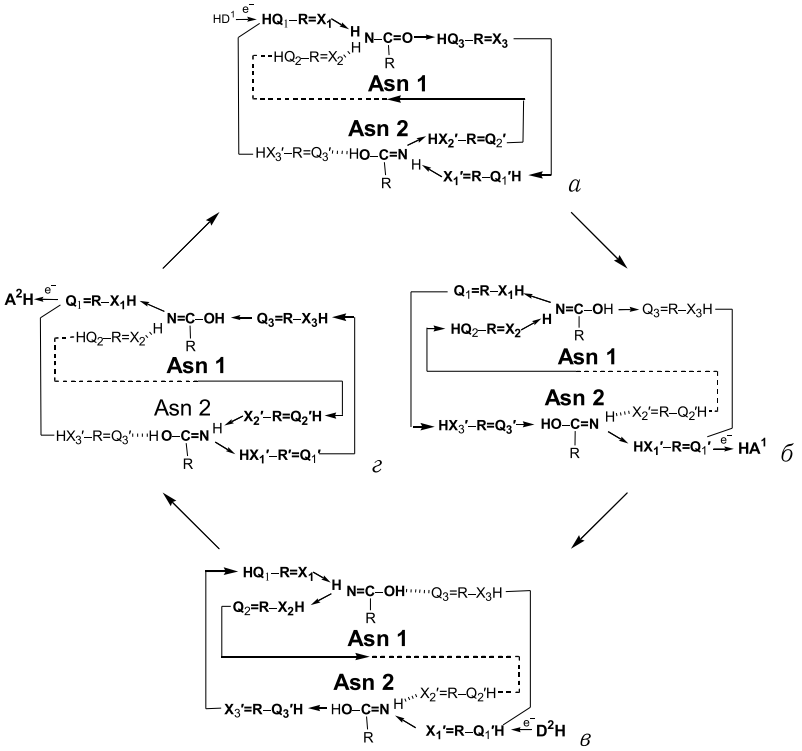


Рис. 6.2. Работа аспарагина в составе ССИВС димерной структуры

с позиции нашей концепции, имеют различное число входов и выходов: 1 вход — 4 выхода (U), 2 входа — 3 выхода (A и C) и 3 входа — 4 выхода (G).

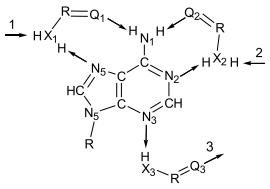
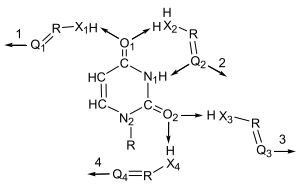
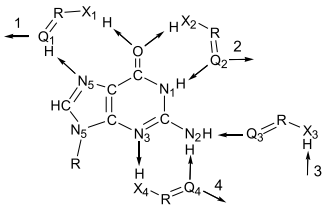
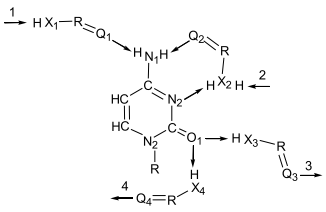
Рассмотрим, для примера, возможную работу аденина (схема 6.26). Предположим, что состояние *а* является исходным. Оно характеризуется тем, что система 1 и система 2 могут работать на вход, а система 3 — на выход. Если в системе 1 появился сигнал, то он с группы $HQ_1–R=X_1$ будет направляться на группу $HN_1–C=N_2$, а с нее, через группу на группу $N_2–C=N_3$ — на группу $HQ_3–R=X_3$ в систему 3. В результате прохождения сигнала аденин перейдет в состояние *б*. При этом система 1 теперь сможет работать на выход, а системы 2 и 3 — на вход. Если теперь сигнал возвратился по системе 3, то он через группу $HN_3–C=N_2$ аденина может попасть на группу $HX_2–R=Q_2$ и уйти в систему 2.

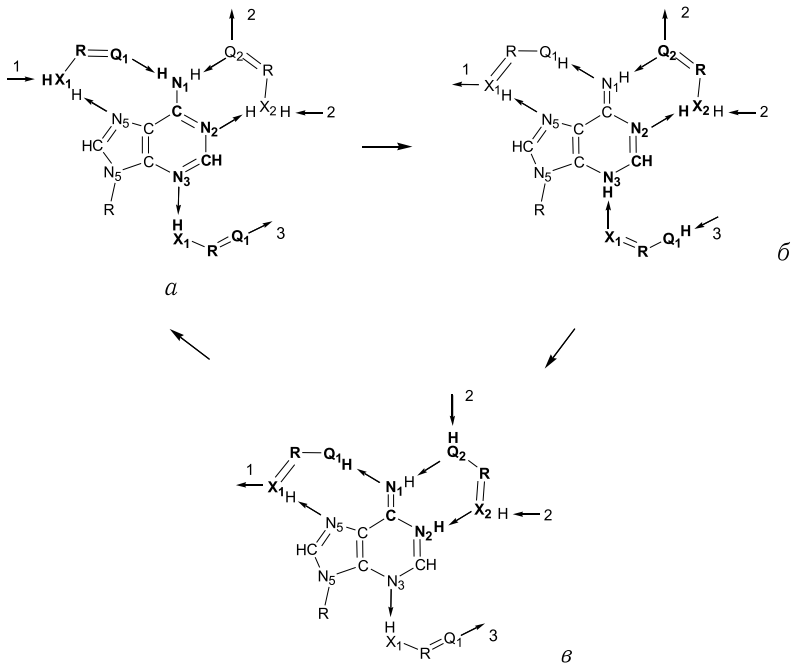
Аденин переходит в состояние *в*. Теперь, если сигнал возвращается из системы 2, то по группе $HQ_2–R=X_2$ он может попасть на $HN_2–C=N_1$ и с нее — в систему 1, в результате чего аденин возвратится в исходное состояние *а*.

Таким образом, на простейшем примере мы показали, что молекула аденина может осуществлять функции управления сигналами, приходящими к ней из нескольких ССИВС. Реально такой процесс может быть значительно сложнее. Аналогично могут быть рассмотрены и другие азотистые основания в составе ССИВС. При этом следует иметь в виду, что каждая из этих молекул, как и функциональные группы аминокислот, в составе дуплицированных структур должны иметь свою пару, находящуюся в противоположном состоянии.

Таблица 6.3

Азотистые основания в составе ССИВС

Аденин (2 входа — 3 выхода)	Урацил (1 вход — 4 выхода)
	
Гуанин (3 входа — 4 выхода)	**Цитозин (2 входа — 3 выхода)**
	



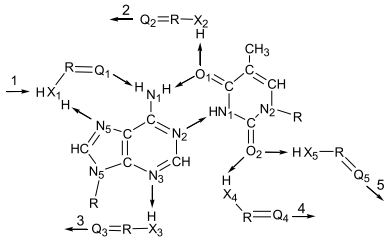
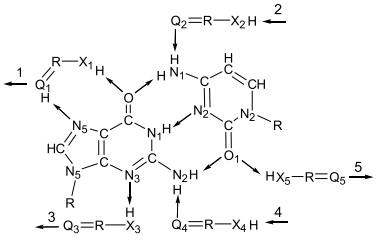
(6.26)

6.2.5. Пары азотистых оснований нуклеиновых кислот. Чтобы завершить анализ азотистых оснований в составе ССИВС, рассмотрим их особенности для

случая комплементарных пар, в которых они находятся, как правило, в составе НК [14]. Эти пары можно рассматривать как единое целое. В табл. 6.5 приведены пары оснований A–T и G–C в составе ССИВС. Как видно в таблице, распределение возможных входов и выходов ССИВС в парах существенно иное, чем в азотистых основаниях. Кроме того, оно различается и между парами. В паре A–T имеется всего 1 вход и 5, в то время как в паре G–C присутствует 2 входа и 5 выходов.

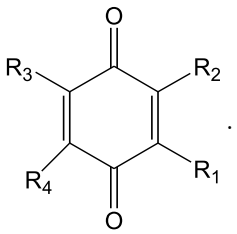
Таблица 6.4

Пары азотистых оснований нуклеиновых кислот в составе ССИВС

аденин — тимин (1 вход — 5 выходов)	гуанин — цитозин (2 входа — 5 выходов)
	

Следует обратить внимание, что расположение входов и двух выходов (у атомов кислорода) в паре G–C является симметричным. Дальнейший анализ ССИВС азотистых оснований, возникающих при взаимодействии пар, расположенных друг над другом, будет проведен с учетом конкретных данных в следующей главе.

6.2.6. Молекулы хинонов. В четвертой главе мы сталкивались с молекулами пластохинона и убихинона, участвующими в цепи переноса электронов, соответственно, при фотосинтезе у растений и в процессе дыхания у животных (раздел 4.1.1.3). Различия между ними незначительны и наблюдаются в основном, в характере заместителей R_n (схема 6.27):

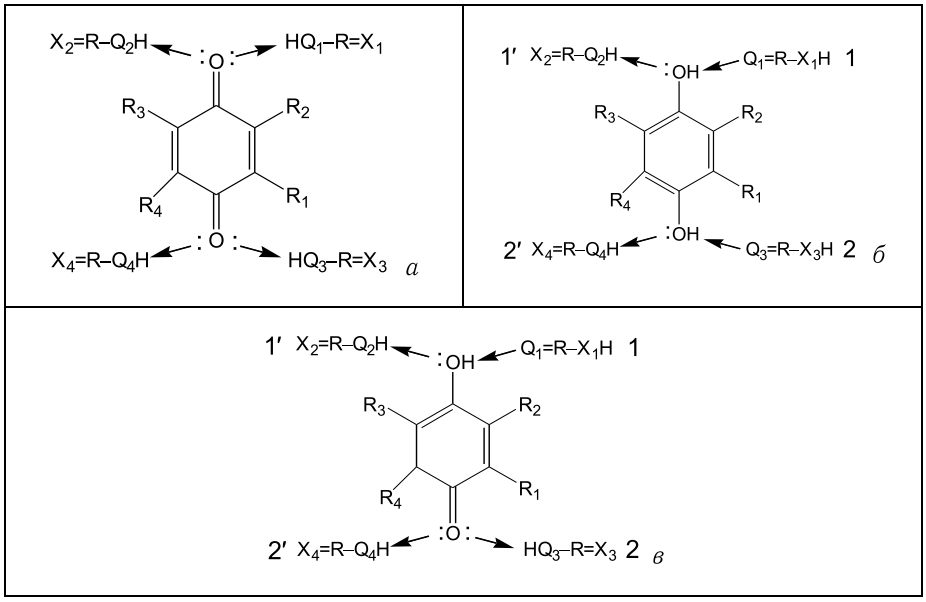


(6.27)

В структуре пластохинона R_3 и R_4 — метильные группы, R_2 — атом водорода, а в структуре убихинона — R_3 и R_4 — оксиметильные группы, R_2 — метильная группа, а R_1 в обоих хинонах — непредельные углеводородные цепи, с числом изопреноидных звеньев от 6 до 12. Ранее эти молекулы в составе ССИВС не рассматривались, однако, учитывая их функциональную значимость, мы проводим этот анализ в данном разделе. В табл. 6.6 приведены различные состояния молекул хинонов в составе ССИВС.

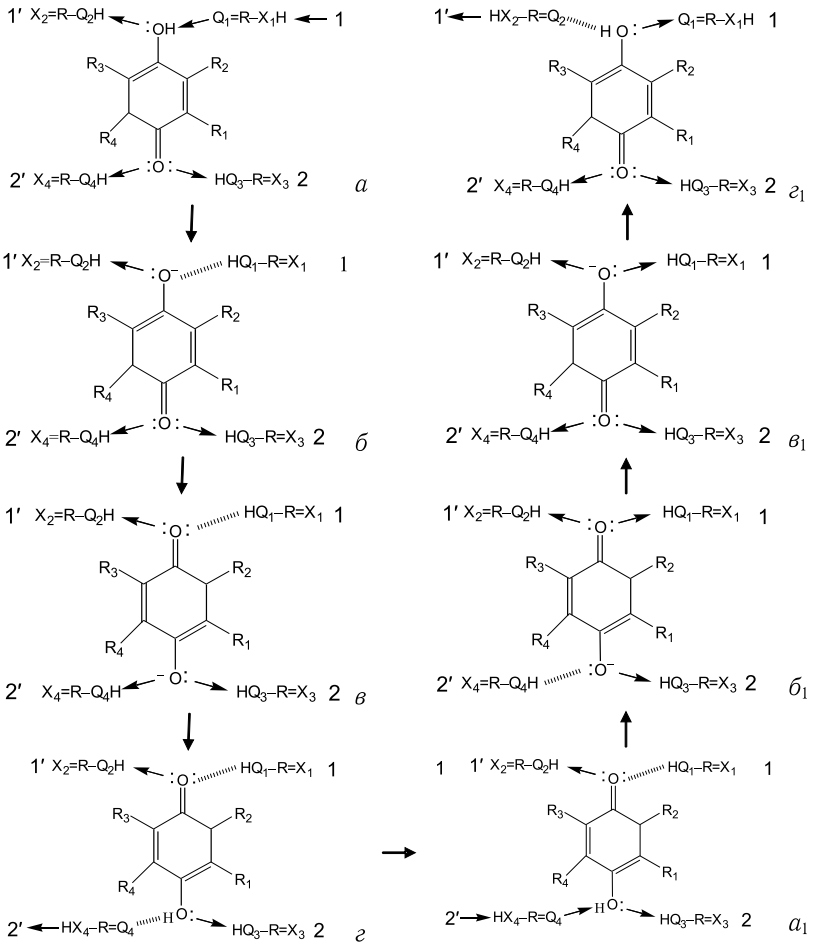
Таблица 6.5

Возможные состояния молекул хинонов в составе ССИВС



В структуре *а*, т. е. оба атома кислорода молекулы хинона находятся полностью окисленном состоянии, т. е. в кето-форме. Такая структура имеет только ни одного входа и поэтому, по-видимому, не имеет функционального значения. В структуре *b* обе молекулы кислорода имеют гидроксильные группы, т. е. находятся в восстановленном состоянии. Наиболее вероятно, что сигнал может двигаться через C=C–OH-группы как в системе 1–1′, так и в системе 2–2′, не переходя при этом в семихинонное состояние. Наконец, структура *в* представляет собой полухинон, т. е. один атом кислорода находится в восстановленном состоянии, с C=C–OH-группой (система 1–1′), а второй — в окисленном (C–C=O-группа, система 2–2′). Эта структура, на наш взгляд, имеет набольший интерес для нашего анализа (схема 6.28). Предположим, что в системе 1 появился сигнал (стадия *а*), который через группу $HQ_1–R=X_1$ направляется к C=C–OH-группе семихинона. Согласно механизму переноса зарядов по ССИВС (раздел 5.2.2.), этот процесс будет сопровождаться отрывом протона от хинона и переходом его в заряженное состояние (стадия *б*). Учитывая лабильность состояний семихинонов, заряд может оказаться на нижней C–C=O-группе (стадия *в*) и вызвать притяжение протона от группы $HQ_4–R=X_4$(стадия *г*). В результате прошел процесс перехода сигнала из подсистемы 1 в подсистему 2′. Теперь, если аналогичный процесс начнется в системе 2′, то все процессы будут идти аналогичным образом (стадии $а_1–г_1$), но в обратном направлении. Заканчивается цикл на стадии $г_1$, в результате чего сигнал из подсистемы 2′ перешел в подсистему 1′. Теперь весь процесс может снова повториться со стадии *а*, но появление сигнала уже будет со стороны группы $HX_1–R=Q_1$ подсистемы 1′. Если предположить, что ССИВС 1 и 2′ принадлежат цепи переноса зарядов, локализованных в одном ансамбле, а 1′ и 2 — во втором, симметричном ансамбле, то в таком случае молекулы хинонов, с позиции нашей концепции, могут выполнять важную функцию переключения двух ансамблей

переноса зарядов, работающих в колебательном режиме.



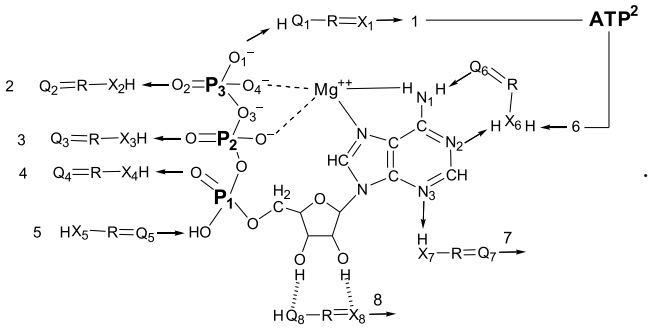
(6.28)

Предпосылки к такому взгляду имеются и будут рассмотрены в гл. 11, посвященной биомембранам.

6.2.7. Доноры зарядов. В процессе проведенного анализа мы часто использовали термины донор заряда и акцептор заряда. В биосистемах к числу наиболее распространенных доноров зарядов, отдающих свой электрон, относятся молекулы аденозинтрифофорной кислоты (АТФ) и другие нуклеозидтрифосфаты, содержащие азотистые основания (ГТФ, ЦТФ, УТФ). Соответственно, нуклеотидтрифосфаты (АДФ, ГДФ, ЦТФ, УТФ) могут служить акцепторами зарядов, при котором происходит образование макроэргической фосфоэфирной связи. В этом разделе мы приведем пример анализ донора заряда, проделанный в работах [3, 4] на молекулах АТФ.

В активном состоянии АТФ связан с ионом двухвалентного металла (Mg^{++}). В его структуре можно выделить три основных блока: блок O–P=O-групп, представляющих собой выходы ССИВС, изолирующий блок рибозного остатка и регулятор-

ный блок — адениловое кольцо, с двумя входами и тремя выходами (схема 6.29):



(6.29)

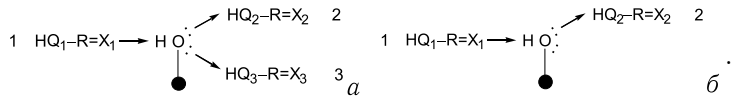
Данная схема предполагает также взаимосвязь данной молекулы АТФ с другой молекулой ($АТФ^2$), находящейся в соседней субъединице. Макроэргическая связь, имеющая энергию порядка 0,5 эВ, локализована в области $P_3–O_3$. Контакт группы $O_2=P–O_1^-$ молекулы $АТФ^1$ с группой $HQ_1–R=X_1$ системы 1 может вызвать переход заряда в эту систему, что будет сопровождаться распадом связи $P_3–O_3$. При этом выход молекулы АДФ и фосфата может регулироваться адениловым кольцом, путем прохождения сигнала по системам 6–8. В анализе предполагалось, что фосфатные группы молекулы АТФ присоединены к нескольким ССИВС.

Анализ возможного функционирования молекул АТФ в структуре ССИВС был проведен нами в 1993 году [3, 4] и воспроизведен в этом разделе практически без изменений. Примерно в это же время и чуть позже появились первые работы по исследованию структуры комплексов нуклеотидтрифосфатов с белками [15]. В следующей главе мы сопоставим предсказательные возможности нашего подхода с реальными данными.

6.3. Полифункциональность биологических молекул

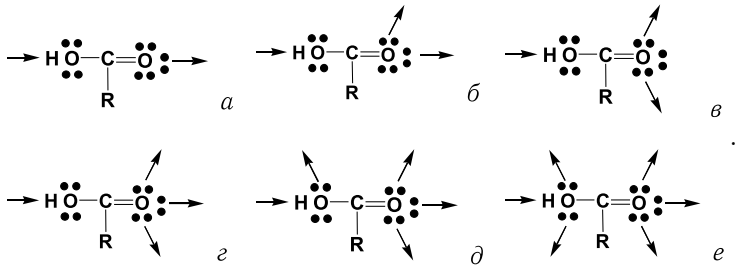
В процессе анализа биомолекул как функциональных модулей ССИВС, мы столкнулись с тем, что одна и та же молекула, в зависимости от числа образуемых водородных связей, может выполнять в составе ССИВС разные функции. Эту особенность можно рассматривать как полифункциональность биомолекул, которая существенно расширяет их функциональные свойства в наноструктурах. Можно выделить два пути изменения функций молекул на молекулярном уровне: за счет использования вырожденности числа выходов и путем модификации числа входов и выходов.

6.3.1. Вырожденность числа выходов. Анализ биомолекул в составе ССИВС показал, что число возможных водородных связей, образуемых неподеленными парами электронов протоноакцепторных групп не обязательно должен быть максимальным. Так например, два состояния группы C–O, приведенные для боковых цепей Ser и Thr в табл. 6.2, показаны на схеме 6.30:



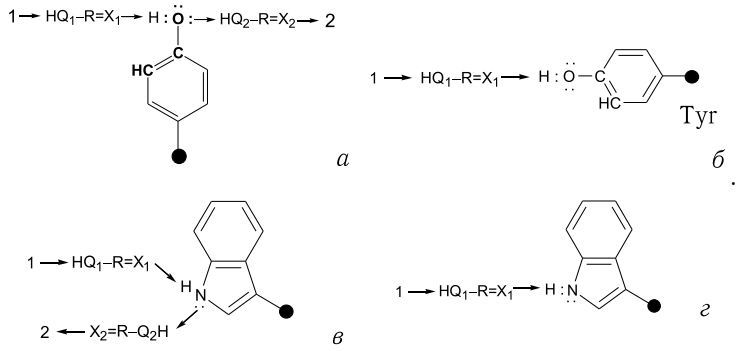
(6.30)

Число связей группы O–C=O может варьировать от 1-й до 5-ти (схема 6.31):



(6.31)

От того, насколько используются неподеленные пары электронов в составе ССИВС, существенно меняется функция гетероциклических боковых цепей аминокислот Tyr и Trp. Так, если в тирозине она используется, то он может выполнять функцию элемента «задержки», включенного параллельно в цепь, а если нет — функцию элемента инверсии (схема 6.32, *а*, *б*). То же наблюдается для триптофана (схема 6.32, *в*, *г*):



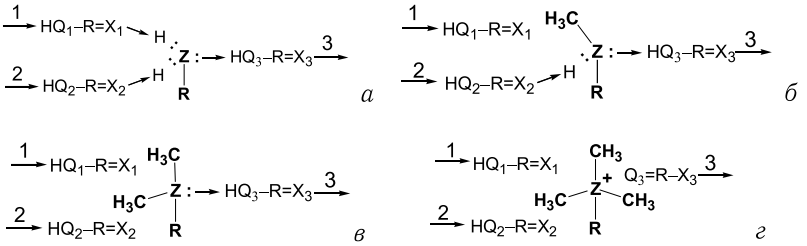
(6.32)

Анализ ССИВС в реальных структурах подтверждает вариабельность числа водородных связей в биомолекулах (см. гл. 7).

6.3.2. Изменение функций биомолекул путем модификации входов и выходов. В биохимии известно несколько типов модификаций, которым подвергаются биомолекулы в составе наноструктур. К ним относят обычно метилирование, ацетилирование и фосфорилирование [16]. Примеры таких модификаций были приведены нами в работе [1]. Рассмотрим эти процессы с позиции концепции ССИВС.

Метилирование. Эта модификация наиболее известна в ДНК и гистонах, связанных с ДНК [17–19] Предположим, что группа R–Z, принадлежащая какой-либо биомолекуле, связывает три ССИВС и имеет 2 входа и 1 выход (схема 6.33, *а*). Введение одной метильной группы вместо атома водорода (схема 6.33, *б*) приводит

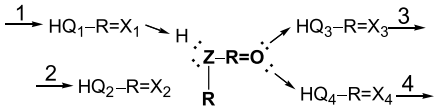
к исчезновению одного из входов и отключению системы 1.



(6.33)

Присоединение второй метильной группы, вместо входа — атома водорода, приводит к отключению системы 2 (схема 6.33, *в*). Функция группы при этом существенно меняется. Она становится элементом, инициирующим ССИВС 3. Наконец, присоединение метильной группы к R–Z со стороны неподеленной пары электронов (схема 6.33, *г*) приводит к тому, что группа становится заряженной (например, как остаток этаноламина в фосфолипиде превращается в остаток холина) и может разделять три независимых ССИВС.

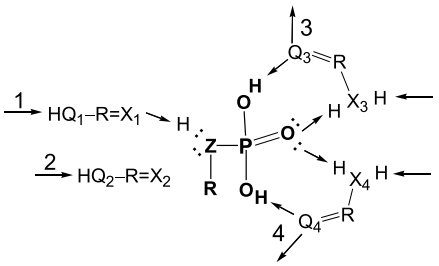
Ацетилирование. Эта модификация, которой часто подвергаются аминогруппы лизина и аргинина различных белков, в частности гистонов [20, 21], может быть представлена как замена атома водорода в группе R–Z (схема 6.33, *а*) на ацетильную группировку (схема 6.34):



(6.34)

При этом простая группа R–Z превратилась в резонансную (Z–C=O) а место входа со стороны системы 2, которая отключилась, образовалось два выхода: в системы 3 и 4. Следовательно, роль ацетилирования, с точки зрения нашей концепции, состоит в переключении ССИВС, отключении одних цепей и включении других, что может обеспечить регуляцию состояния той или иной области наноструктуры.

Фосфорилирование. Чаще других фосфорилированию подвергаются белки и в них, конкретно, C–OH-группы серина и треонина, а также C=C–OH-группы остатков тирозина [22–25]. Важную роль эта модификация играет в сигнальных белках [26, 27]. В составе ССИВС фосфорильный остаток, связанный с группой R–Z, будет выглядеть так (схема 6.35):



(6.35)

Аналогично ацетилированию, при фосфорилировании будет происходить отсоединение системы 2, а к HO–P=O-группам будут присоединяться системы 3 и 4. Появле-

ние фосфатной группировки может привести к включению ранее разомкнутых систем (например, систем 3 и 4), что будет обеспечивать усиление энерго-информационных процессов в ССИВС. Это, в принципе, совпадает с существующими взглядами на фосфорилирование в биологических структурах [26].

Таким образом, вырожденность входов и модификация входов и выходов путем введения метильных, ацетильных и фосфатных групп, как мы показали, является проявлением полифункциональности биомолекул в составе наноструктур. Она существенно расширяет функциональные возможности биомолекул. Существенное значение это свойство биомолекул приобретает в тех случаях, когда необходимо изменение функционального состояния наноструктур в процессе их функционирования, а также в зависимости от состояния живой клетки, в которой они находятся.

Литература к главе 6

1. *Карасев В.А.*, *Стефанов В.Е.*, *Курганов Б.И.* Надмолекулярные биоструктуры: организация, функционирование, происхождение. В кн.: Итоги науки и техники. Сер. Биол. химия. Т. 31. — М.: ВИНИТИ, 1989. — 199 с.
2. *Карасев В.А.*, *Стефанов В.Е.* Об элементной базе молекулярной биоэлекроники // В кн.: Биомолекулярная электроника и проблема самосборки надмолекулярных структур / Под ред. П.И. Лазарева. — Пущино: Научный центр биологических исследований, 1987. С. 45–53.
3. *Карасев В.А.*, *Лучинин В.В.*, *Стефанов В.Е.* Как построить биочип // Биотехнология. 1993. № 2. С. 3–15.
4. *Karasev V.A.*, *Luchinin V.V.*, *Stefanov V.E.* A model of molecular electronics based on the concept of conjugated ionic-hydrogen bond systems // Adv. Mater. Opt. Electron. 1994. V. 4. P. 203–218.
5. *Pauling L.*, *Corey R.B.*, *Branson H.R.* The structure of proteins. Two hydrogen-bonded helical configurations of the polypeptide chain // —Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1951. V. 37. P. 205–211.
6. *Pauling L.*, *Corey R.B.* The pleated sheet, a new configuration of polypeptide chain // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1951. V. 37. P. 205–256.
7. *Финкельштейн А.В.*, *Птицын О.Б.* Физика белка. — М.: Книжный дом «Университет», 2002. — 376 с.
8. *Naismith J.H.*, *Emmerich C.*, *Habash J.*, *Harrop S.J.*, *Helliwell J.R.*, *Hunter W.N.*, *Raftery J.*, *Kalb A.J.*, *Yariv J.* Refined structure of concanavalin A complexed with alfa-methyl-D-pyranoside at 2.0 angstroms resolution and comparison with the saccharide-free structure // Acta Crystallogr. Sect. D. 1994. V. 50. P. 847–858.
9. *Карасев В.А.*, *Лучинин В.В.* Молекулярная архитектура органических сенсорных наносистем // Петербург. ж. электроники. 2001. № 4. С. 12–32.
10. *Karasev V.A.*, *Luchinin V.V.*, *Stefanov V.E.* Topological coding: Towards new materials for molecular electronics // Adv. Funct. Mater. 2002. № 12. P. 461–469.
11. *Карасев В.А.*, *Лучинин В.В.* О некоторых аспектах элементной базы белков структурных модулей нейронов. Труды конференции по Нейрокомпьютерам (уточнить данные).
12. *Карасев В.А.* Генетический код: новые горизонты. — СПб: Тесса, 2003. — 144 с.
13. *Дорфман В.Ф.* О топологической разрешимости интегральных структур без совмещений // Микроэлектроника. 1975. Т. 4. С. 213–219.
14. *Страйер Л.* Биохимия. В 3-х томах / Пер. с англ. — М.: Мир, 1985. Т. 3. — 397 с.
15. *Watson J.D.*, *Crick F.H.C.* Molecular structure of nucleic acid. A structure for deoxyribose nucleic acid // Nature. 1953. V. 171. P. 737–738.
16. *Kabsh W.*, *Mannherz H.G.*, *Suck D.*, *Pai E.F.*, *Holmes K.C.* Atomic structure of the actin / DN-ase 1 complex // Nature. 1990. V. 347. P. 37–44.
17. *He H.*, *Lehming N.* Global effects of histone modifications // Brief Funct. Genomic Proteomic. 2003. V. 2. P. 234–43.
18. *Pennings S.*, *Allan J.*, *Davey C.S.* DNA methylation, nucleosome formation and positioning // Brief Funct. Genomic Proteomic. 2005. V. 3. P. 351–61.

19. *Peters A.H.*, *Schubeler D.* Methylation of histones: playing memory with DNA // Curr. Opin. Cell. Biol. 2005. V. 17. P. 230–8.
20. *Ballestar E.*, *Esteller M.* The epigenetic breakdown of cancer cells: from DNA methylation to histone modifications // Prog. Mol. Subcell. Biol. 2005. V. 38. P. 169–181.
21. *Bulger M.* Hyperacetylated chromatin domains: lessons from heterochromatin // J. Biol. Chem. 2005. V. 280. P. 21689–21692.
22. *Huo X.*, *Zhang J.* Important roles of reversible acetylation in the function of hematopoietic transcription factors // J. Cell. Mol. Med. 2005. V. 9. P. 103–112.
23. *Foster E.R.*, *Downs J.A.* Histone H2A phosphorylation in DNA double-strand break repair // FEBS J. 2005. V. 272. P. 3231–3240.
24. *Tootle T.L.*, *Rebay I.* Post-translational modifications influence transcription factor activity: a view from the ETS superfamily // Bioessays. 2005. V. 27. P. 285–98.
25. *Lowndes N.F.*, *Toh G.W.* DNA repair: the importance of phosphorylating histone H2AX // Curr Biol. 2005. V. 15. P. R99–R102.
26. *Salvi M.*, *Brunati A.M.*, *Toninello A.* Tyrosine phosphorylation in mitochondria: a new frontier in mitochondrial signaling // Free Radic. Biol. Med. 2005. V. 38. P. 1267–1277.
27. *Pawson T.*, *Scott J.D.* Protein phosphorylation in signaling — 50 years and counting // Trends Biochem. Sci. 2005. V. 30. P. 286–90.
28. *Stoker A.W.* Protein tyrosine phosphatases and signalling // J. Endocrinol. 2005. V. 185. P. 19–33.

Глава 7

РЕАЛИЗАЦИЯ ПРИНЦИПА НЕПРЕРЫВНОСТИ ССИВС В БИОСТРУКТУРАХ

7.1. Базовые положения

В настоящее время информация о структурах, изученных различными структурными методами — рентгеноструктурныя анализом (РСА), ядерным магнитным резонансом (ЯМР) и другими, благодаря концентрации этих данных в информационных банках (например, в Protein Data Bank), развитию Интернета и наличию визуализирующих программ, становится все более доступной. К настоящему времени количество известных структур белков, НК и их комплексов составляет более четырех тысяч и их число постоянно увеличивается. В этой книге мы не раз будем пользоваться этими данными в соответствующих главах для иллюстрации отдельных аспектов и положений нашей концепции. Систематический анализ ССИВС может стать предметом отдельной, пока не написанной монографии. В этой же части книги, посвященной наиболее общим аспектам концепции ССИВС, будут рассмотрены в основном конкретные примеры ССИВС. Такой анализ проводился нами и ранее [1]. Однако, наличие собственной программы (Protein 3D), разработанной в ЦМИД одним из авторов этих строк (В. А. Карасевым) совместно с программистом Е. Л. Демченко, существенно расширило наши возможности. Она позволяет приводить именно те примеры, которые нам необходимы. Кроме иллюстративного назначения, эти данные служат доказательством основного тезиса книги: принципа непрерывности ССИВС при построении бионических наноструктур.

В работе [1] на основе известных в то время структур были сделаны следующие выводы (воспроизводим по тексту с. 78)):

« — ССИВС реально присутствуют в надмолекулярных структурах и играют важную роль в межмолекулярных и внутримолекулярных взаимодействиях.

— в структуре белков ССИВС включают в себя как системы пептидных связей, так и связанные с ними в единое целое системы из полярных групп. Часто такие системы содержат различные лиганды и включают иногда в себя одиночные молекулы воды.

— расположение простых и резонансных групп в ССИВС допускает асимметричную расстановку протонов (в то время не было данных с высоким разрешением, где можно было увидеть положение атомов водорода в ССИВС). Это позволяет сделать заключение, что данные системы могут иметь определенное направление.

ССИВС представляют собой своего рода каркас, вокруг которого располагаются неполярные части белковых глобул. И хотя важную роль при формировании белковых глобул играют гидрофобные взаимодействия, для теоретического рассмотрения

вполне достаточно информации о ССИВС. Это позволяет нам говорить о справедливости сформулированного нами положения, что ССИВС могут служить основой построения надмолекулярных структур. Развивая это положение, мы постулируем, что ССИВС должны не прерываясь переходить из одной структуры в другую. Некоторые примеры таких переходов были приведены. Иными словами, мы формулируем принцип непрерывности (континуальности) ССИВС при построении надмолекулярных биоструктур: биологические структуры должны строиться на основе непрерывных ССИВС».

Если принять принцип континуальности, развитый в работе [1], то становится понятным, почему далеко не все полярные аминокислоты, находящиеся на поверхности белковых глобул, входят в состав ССИВС. Большинство структур, изученных методом РСА, является лишь частью интегральных многокомпонентных комплексов и изолированы из своего естественного окружения. В комплексах же они должны формировать такие системы. И в самом деле, структурные исследования, проводимые в настоящее время, вышли на такой уровень, когда стало возможным расшифровать структуру целых надмолекулярные комплексы. Примерами могут служить структуры комплекса цепи переноса электронов (цитохром С оксидазы [2], комплекса цитохромов $b–c_1$, [3]), комплекс белков токсина из Bordetella pertusis (белковый сенсор) [4], комплексы гистонов (нуклеосомы) с фрагментами нуклеиновых кислот [5] и других. Идея непрерывности ССИВС в биоструктурах, сформулированная в работе [1], в этих комплексах нашла полное подтверждение. В конце этой главы мы покажем, как реализован принцип континуальности ССИВС для нуклеосом, остальные примеры будут приведены в главах, посвященных структуре биомембран (гл. 11) и биосенсоров (гл. 12).

Прежде чем начинать анализ конкретных структур необходимо сказать о том, каким образом проводилось выделение ССИВС, и в каком виде они будут приводиться в книге. Программа Protein 3D использует данные декартовых координат атомов, взятые из Protein Date Bank. На основе этих данных программа визуализирует различные типы структур, в том числе ССИВС. Водородные связи определяются программой по расстоянию (в пределах от 2,2–3,5 ангстрем). При выведении ССИВС используются те же обозначения групп, что и в нашей книге. Например, пептидная связь и боковые цепи аспарагина и глютамина представлены как N–C=O-группы, боковые цепи аспрагиновой и глютаминовой кислот — как O–C=O-группы и т. д. Исключения составляют циклические аминокислоты (His, Tyr, Trp), которые изображаются целиком, хотя и в упрощенном виде. Выделение связанных в единую систему ССИВС производится наведением курсора мыши на одну из связей или атом и нажатием левой кнопки мыши два раза. При этом программа пририсовывает только ту ССИВС, которая связана в единую систему и не прерывается. В качестве примере на рис. 7.1 показан фрагмент блока ССИВС, входящего в структуру бактериородопсина (файл 1c3w [6], разрешение 1,55 А).

Как видно на рис. 7.1, *а*, полученном непосредственно программой в масштабе (показан в левом верхнем углу), на фрагменте блока ССИВС хорошо видна связь Tyr 131 с ССИВС, состоящей из HN–C=O-групп, уходящих в структуру белка. При этом можно увидеть, что к этой же ССИВС присоединены O–C=O-группы (атомы $OE_1$194 и $OE_2$194, а также $OE_1$204 и $OE_2$204) боковых цепей аминокислот Glu 194 и Glu 204, и C–OH-группа (атом 193 OG) Ser 193. Однако представление результатов трассировки непосредственно в виде рисунка программы обладает рядом недостатков:

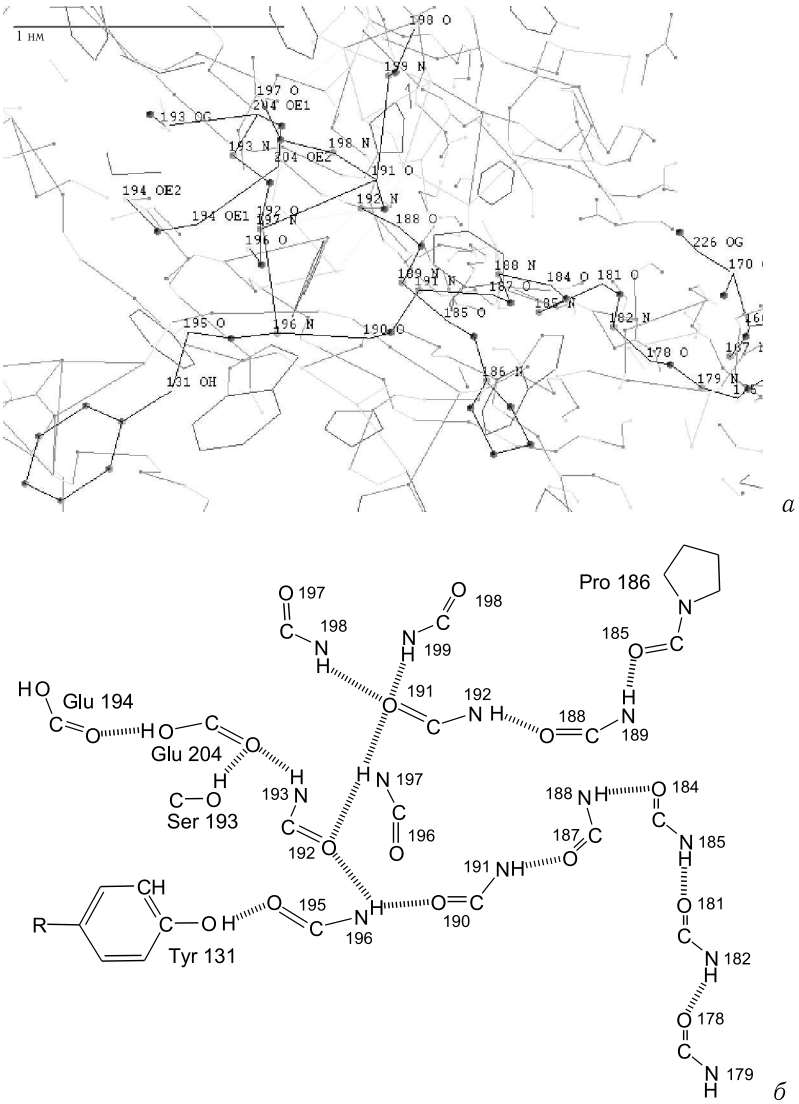


Рис. 7.1. Фрагмент блока ССИВС из бактериородопсина (файл 1c3w): *а* — рисунок, сделанный программой; *б* — схема ССИВС этого фрагмента

— много лишних деталей от фона;

— отдельные связи, хорошо видимые при трехмерном изображении структуры на мониторе, на плоскости перекрываются;

— атомы водорода и двойные связи, как правило, не выявляются.

Все эти недостатки устраняются в процессе построения схемы, а атомы водорода и двойные связи расставляются в соответствии с химическими свойствами групп и асимметрией положения атомов водорода в ССИВС. Так, на рис. 7*б* значительно четче стало видно наличие вилочковых водородных связей у атомов N197 и N196, благодаря которым Tyr 131 связан с O–C=O-группами боковых цепей аминокислот

Glu 194 и Glu 204, а также C–OH-группой Ser 193. Видно также, что Tyr 131 также связан по ССИВС с Pro 198. По этим причинам, там, где это необходимо, в качестве иллюстраций нами будут использоваться не оригинальные рисунки, а схемы ССИВС, построенные на их основе.

7.2. Белковые структуры

7.2.1.1. ***Блоки ССИВС и роль α-спиралей в их формировании.*** Задачи настоящего раздела показать существование блоков ССИВС в белках и роль в них α-спиралей. Моделью для такого показа может служить светочувствительный белок бактериородопсин, аналог родопсина животных. Этот белок находится в большом количестве в плазматических мембранах бактерий Halobacterium salinarum. Он состоит из трех одинаковых по аминокислотному составу и симметричных (группа симметрии C_3) субъединиц, т. е. является тримером [6]. Изучению бактериородопсинов из разных источников посвящено большое количество структурных работ, в том числе высокого разрешения (см. раздел 7.1., файл 1c3w).

Общий вид структуры показан рис. 7.2, *а*. На этом же рисунке показано расположение трех наиболее крупных блоков, выделенных с помощью программы Protein 3D (рис. 7.2., *б–г*). Детальная структура блока-1 (*б*) показана на рис. 7.3. Как видно на этом рисунке, каркасом блока служат ССИВС из HN–C=O-групп α-спирали, из которых наиболее важной является фрагмент, начинающийся с 203–202 HN–C=O-группы и заканчивающийся 225–224 HN–C=O-группой (назовем его условно фрагмент 1). К ней непосредственно присоединены Trp 12, Tyr 57 и Tyr 185, а в конце системы — Lys 30 и Tyr 43. Параллельно, в той же α-спирали проходят еще две ССИВС, но к ним присоединены лишь остатки Thr 205 и Ser 214. Кроме ССИВС из HN–C=O-групп заметна еще одна ССИВС, в которую, как видно на рисунке, входят Arg 82, Tyr 57, Asp 212, Tyr 185, а чуть далее — Trp 86, Lys 216, Thr 89. Благодаря двум водородным связям Trp 86 эта ССИВС связана с системой HN–C=O-групп другой спирали, которая начинается с 83–84 HN–C=O-группы и заканчивается 101–100 HN–C=O-группой. Таким образом, из двух триптофанов один (Trp 12) может служить элементом инверсии, а другой (Trp 86) — элементом задержки сигнала. Из трех тирозинов, находящихся в этом блоке, два можно интерпретировать как элементы задержки (Tyr 57, Tyr 43) и один — как элемент инверсии (Tyr 185). Аналогичным образом могут быть рассмотрены структуры блоков 2 и 3.

Следует отметить, что в формировании ССИВС участвуют боковые цепи разных типов. Часть из них (например, Thr 205, Ser 214, Thr 89, Trp 86) образуют водородные связи с системами HN–C=O-групп той же α-спирали, на которой находятся, что может указывать на их образование в момент или вскоре после синтеза данного фрагмента белка. Другие же боковые цепи (Trp 12, Lys 30, Tyr 43, Tyr 57, Tyr 185) могут включиться в ССИВС только после по мере формирования фрагмента 1.

При детальном анализе тримера [7] (файл 1brr) было найдено, что эти ССИВС являются раздельными, причем только структура субъединицы A полностью совпадает с приведенной на рис. 7.3., в субъединице B к этой структуре присоединяются еще две ветви HN–C=O-групп, а в субъединице C Trp 12, связанный с HN–C=O-группой 202–201, полностью отсоединен от остальной части ССИВС.

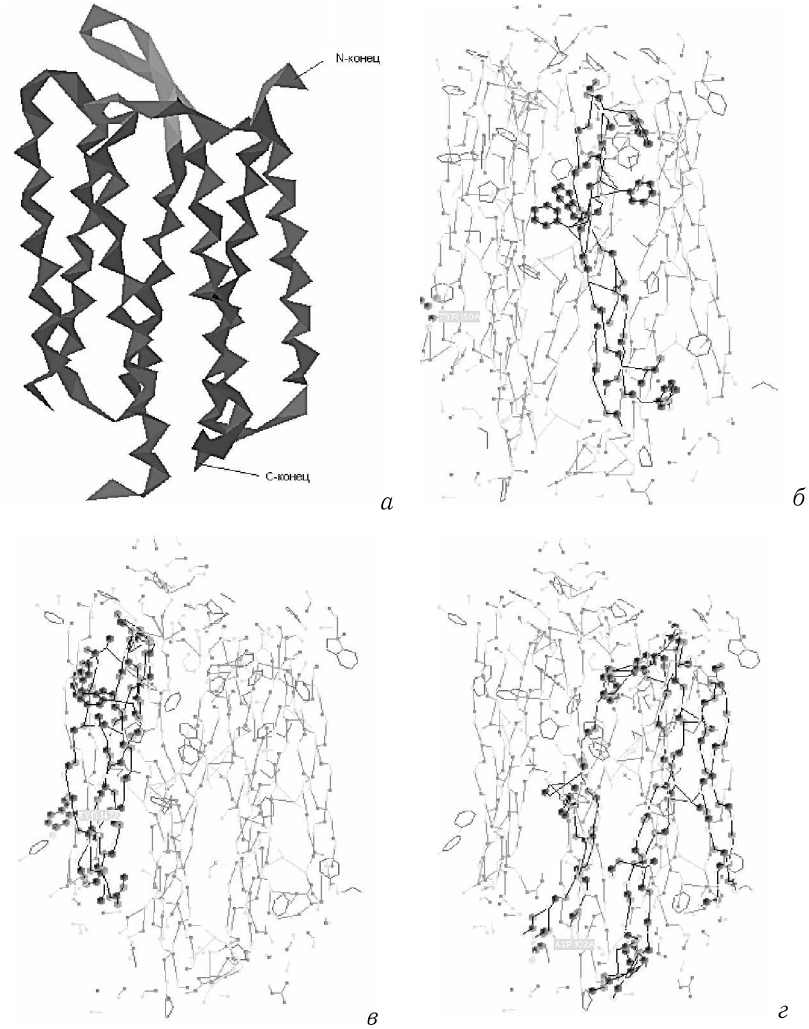


Рис. 7.2. Структура бактериородопсина (*а*) и локализация на ней блоков ССИВС — 1 (*б*), 2 (*в*) и 3 (*г*) (файл 1c3w)

Эти факты свидетельствуют о том, что ССИВС не являются жестко фиксированными и могут перестраиваться в зависимости от функционального состояния субъединиц.

7.2.1.2. ***Участие*** **β-*структур.*** Белком, на котором можно рассмотреть этот тип взаимодействия, может служить фермент люцифераза, который относится к числу флавопротеинов, т. е. содержит в своем составе пигмент флавин. Белки этого типа встречаются как у животных (жуки-светляки) [8], так и у микроорганизмов [9, 10]. В качестве примера мы рассмотрим бактериальные люциферазы, выделенные из микроорганизмов Vibrio Harveyi (1luc [9]) и Photobacterium Leiognathi (1nfp [10]), между которыми имеется определенное сходство. Белок 1luc исследован с разрешением 1,5 А. Содержит как α-спиральные, так и β-структурные участки и состоит из двух идентичных субъединиц (гомодимер).

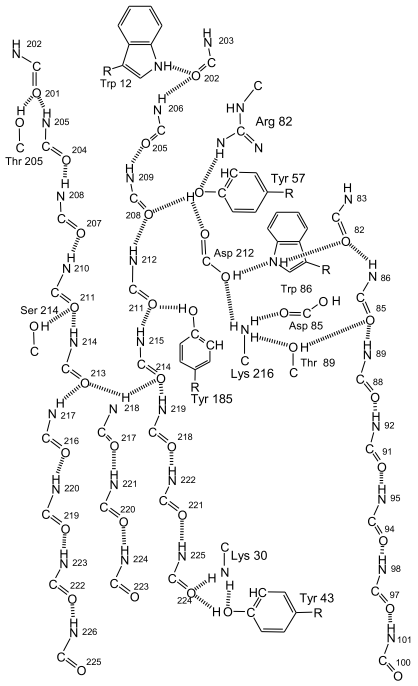


Рис. 7.3. Блок-1 ССИВС бактериородопсина (файлы 1c3w [6], 1brr [7])

На рис. 7.4 показан фрагмент ССИВС, сформированный их HN–C=O-групп β-структуры. Из рисунка видно, что His 224 связан с ССИВС антипараллельной β-структуры (видно, что HN–C=O-группы составлены из разных частей молекулы и их нумерация чередуется сверху вниз), которая соединяется с другой ветвью с помощью Thr 73. Эта вторая ветвь имеет связь с Glu 328, которая, в свою очередь, связана с третьей ветвью β-структуры. Таким образом, все три ветви β-структуры связаны между собой при помощи боковых цепей аминокислот.

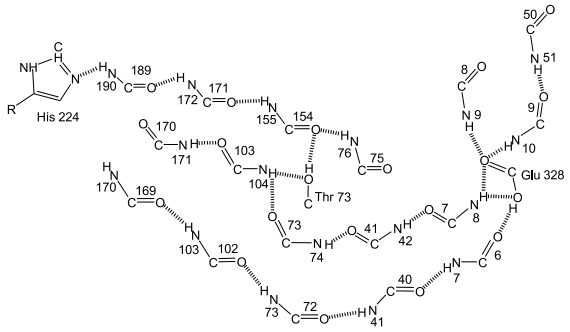


Рис. 7.4. Блок ССИВС, сформированный на основе β-структуры в бактериальной люциферазе Vibrio Harveyi (1luc [9])

7.2.1.3. ***Роль молекул воды в формировании ССИВС.*** В разделе 5.2.3 теоретически был рассмотрен вопрос о роли молекул воды в формировании ССИВС. Нами

был сделан вывод о том, что присутствие одиночных молекул воды не нарушает непрерывность ССИВС и, вместо С–ОН-группы, ОН-группа воды может участвовать в переносе зарядов.

Обычно данные о структуре белков содержат информацию и о положении атомов кислорода одиночных молекул воды. Выше мы привели примеры, не принимая в расчет эту информацию. Однако это может приводить к весьма существенному искажению и упрощению реальной сложности структуры ССИВС. В качестве примера используем ту же структуру люциферазы (файл 1luc [9]). На рис. 7.5, *а* показан фрагмент ССИВС, который выделяется программой без использования координат атомов кислорода от молекул воды. Эта ССИВС имеет небольшую протяженность и в ней участвует группировка Tyr 171, подписанная на рисунке.

Тот же фрагмент белка, но с использованием координат атомов кислорода, показан на рис. 7.5, *б*. На нем видно, что протяженность и степень разветвления ССИВС существенно увеличилась.

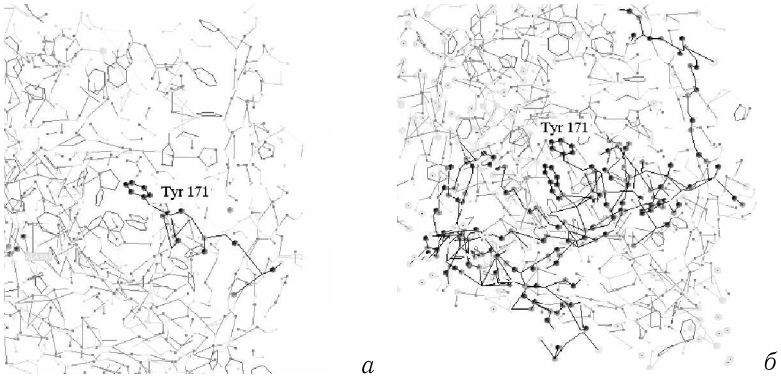


Рис. 7.5. Структура ССИВС, выделяемая программой PROTEIN 3D, без учета (*а*) и с учетом (*б*) координат атомов кислорода молекул воды (файл 1luc [9])

Приведенный пример наглядно показывает, что структурная вода играет существенную роль в формировании ССИВС. Однако, в последующем изложении во многих случаях, в чисто иллюстративных целях, где это не существенно влияет на суть рассматриваемого вопроса, мы будем использовать структуры без учета молекул воды.

7.2.1.4. ***Взаимодействие субъединиц.*** Белок люцифераза мы использовали также для показа возможности перехода ССИВС, из одной субъединицы в другую. На рис. 7.6 показан пример такого перехода ССИВС из субъединицы А в субъединицу В (файл 1luc [9]). Атом водорода при N 61 образует вилочковую водородную связь с атомом О 57 своей ССИВС и атомом О 60 соседней субъединицы. Однако, необходимо отметить, что эти ССИВС имеют как элементы сходства, так и некоторые различия. Например, хорошо видно, что Arg 100A имеет связь с Asp 37A, а Arg 100B — с Asp 32 B. Эти отличия обусловлены, вероятно, с различиями функционального состояния субъединиц А и В. Следует также отметить, что в данном примере имеет место контакт двух α-спиралей.

Такие контакты встречаются значительно реже, чем переход β-структур из одной субъединицы в другую. Примером может служить взаимодействие А и В субъединиц

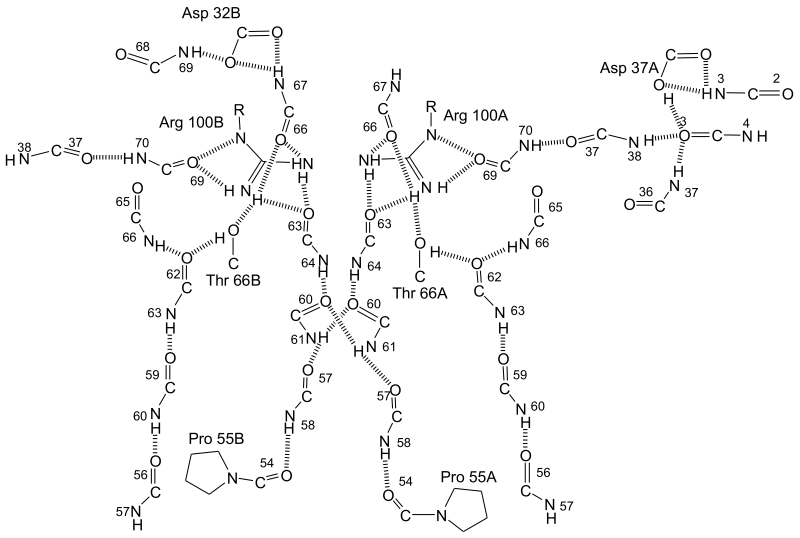


Рис. 7.6. Взаимосвязь блоков ССИВС A и B субъединиц бактериальной люциферазы Vibrio Harveyi (файл 1luc [9])

в конканавалине A (файл 5cna [11]), показанное на рис. 7.7. На этом рисунке видно, что две ССИВС параллельны и симметричны друг другу, о чем можно судить по расположению His 127 в центральной области.

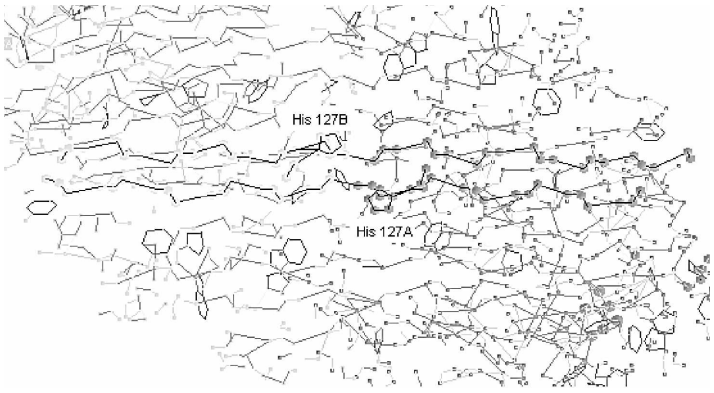


Рис. 7.7. Переход ССИВС в из одной субъединицы в другую по β-структуре в конканавалине A (файл 5cna [11])

7.2.2.1. ***Взаимодействие ССИВС и кофактора внутри субъединицы.*** К сожалению, данные о структуре приведенной выше люциферазы неполны, поскольку в ней отсутствует флавиновый кофактор. Мы восполнили этот пробел, используя структуру другой люциферазы, выделенной из Photobacterium Leiognathi (1nfp [10]).

Этот белок исследован с разрешением 1,6 Å. Он имеет выраженную симметрию и является, вероятно, функциональным димером. Содержит две молекулы флавинмононуклеотида (ФМН), связанных с белком различным образом. На рис. 7.8 показан пример взаимодействия одного из кофакторов (ФМН-1) с ССИВС люциферазы. В их образовании, как видно на рисунке, участвует целый ряд аминокислот: Tyr 221, связанный с изоаллоксазиновым кольцом флавина с одной стороны, Trp 4, присоединенный к нему с другой стороны, боковые цепи аминокислот Arg 125, Asp 193, Asn 5, Arg 222, Arg 127, His 73, а также многочисленные фрагменты

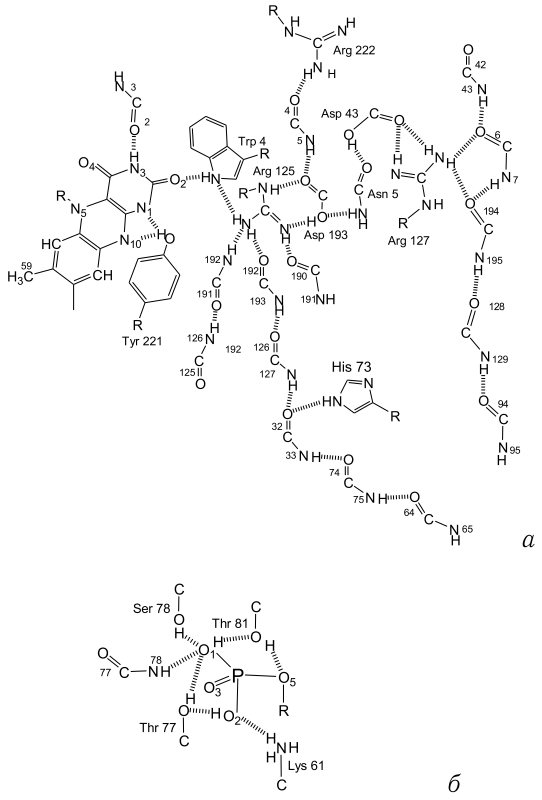


Рис. 7.8. Связь флавина флавинмононуклеотида-1 (ФМН-1) (*а*) и фосфатной группы ФМН-2 (*б*) с ССИВС люциферазы (файл 1nfp [10])

β-структуры белка. Следует отметить, что фосфатная группа первого кофактора практически не взаимодействует с белком, в то время как во втором кофакторе (ФМН-2, рис. 7.8, *б*) в образовании ССИВС участвует именно фосфатная группа, а с флавином взаимодействия нет. Такая функциональная асимметрия нам еще не раз встретится при анализе работы ферментов.

7.2.2.2. *Взаимодействие ССИВС с донорами заряда.* Доноры зарядов можно, в общем случае, можно рассматривать как специфический тип кофакторов, обеспечивающих энергией и приводящих в движение наноструктуры. Как было рассмотрено в гл. 6, такими донорами являются нуктеотидтрифосфаты (АТФ, ГТФ и другие). За последние пятнадцать лет получено много данных о структуре комплексов

нуклеотидтрифосфатов (НТФ) с белками [12–16]. Помимо ряда общих моментов наблюдается значительное разнообразие взаимодействия НТФ и их мест связывания с белками. Эти данные требуют специальной работы по их систематизации. Попытка обобщенного представления взаимодействия ГТФ с сигнальными белками приведена в нашей книге [17]. На рис. 7.9. (цветная вклейка), взятом из этой работы, показано, что взаимодействие с белком происходит для этой молекулы в трех областях (см. раздел 6.2.6): области фосфатных групп — спиральный фрагмент; области рибозы и азотистого основания. При этом, как видно на рисунке, все блоки ГТФ так или иначе взаимосвязаны между собой.

В качестве примера взаимодействия молекул АТФ с белками мы рассмотрим НАД-синтетазу из Bacillus subtilis (файл 1nsy [12]). Этот белок, как показано на рис. 7.10., состоит из двух субъединиц и способен присоединить четыре молекулы АТФ. Мы выделили ССИВС лишь для двух из них. Рассмотрим подробнее одну из субъединиц. Область фосфатных групп $АТР_1$ (в прямоугольнике эти группы видны как серые кружки большего, чем другие атомы размера) в А-субъединице формирует обширный блок ССИВС (над и под фосфатными группами). Системы,

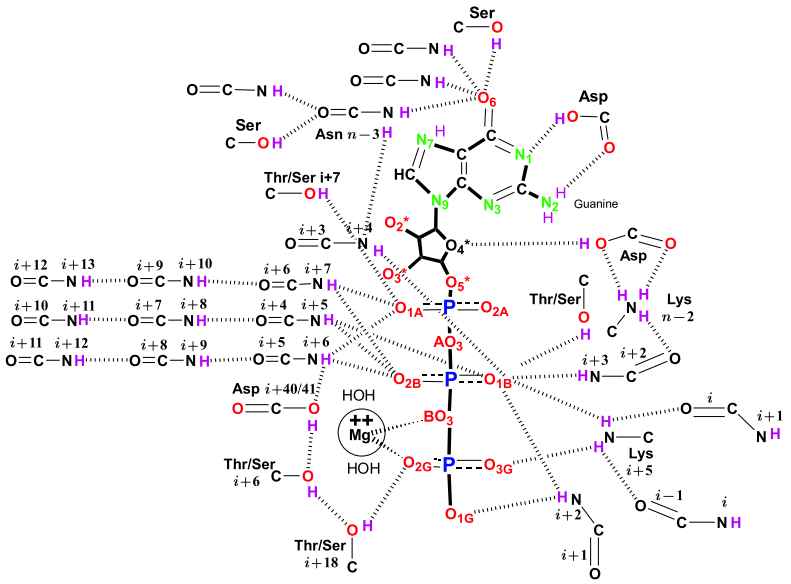


Рис. 7.9. Принципиальная схема строения систем сипряженных ионно-водородных связей в ГТФ-азного центре ряда G-белков: n принимает значения: 118 (1grn), 125 (1rrp), 138 (3rab), 268 (1tad), 272 (1aso); i принимает значения: 11(1grn), 18 (1rrp), 30 (3rab), 37 (1tad), 41 (1aso)

идущие из прямоугольника сверху вниз, представляют собой три ССИВС, состоящие из HN–C=O-групп. Это протяженный фрагмент α-спирали. Аналогичные фрагменты найдены во многих НТФ-связывающих белках [17].

Как видно на рис. 7.10, α-спиральный фрагмент контактирует с другим участком белка, представляющим собой β-структуру, направленную слева направо, с которой связана область азотистого основания молекулы $АТР_3$ (в кружке), также находящейся в А-субъединице. Аналогично выглядят ССИВС для В-субъединицы ($АТФ_2$ и $АТФ_4$).

Характерно, что ССИВС наблюдаются между фосфатными группами одной молекулы и областью связи азотистого основания другой молекулы АТФ. Отсутствие связи между этими двумя участками для одной молекулы, по-видимому, связано с тем,

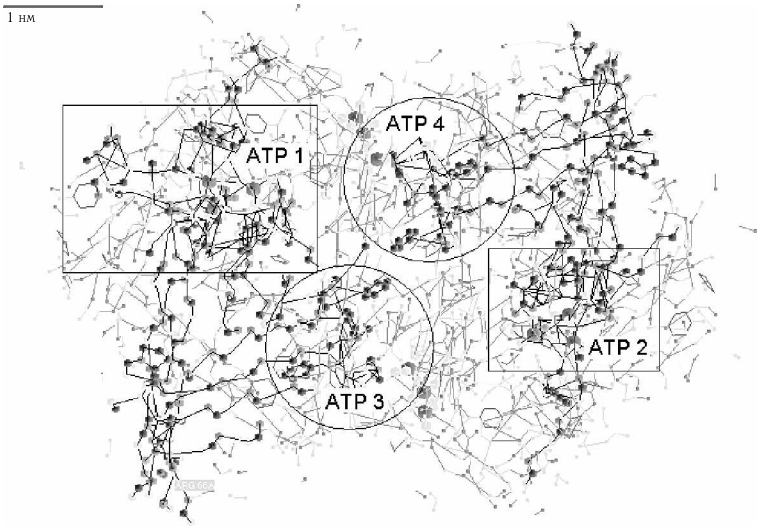


Рис. 7.10. Структура ССИВС, участвующей в связывании АТФ, фермента НАД-синтетазы Bacillus subtilis (файл 1nsy [12])

что область фосфатных групп обеспечивает, вероятно, введение заряда в ССИВС, в то время как азотистое основание выполняет регуляторные функции для второй молекулы. Сравнение с анализом возможного функционирования молекул АТФ в структуре ССИВС [18, 19] показывает, что в общих чертах мы достаточно точно предсказали возможную структурную организацию ССИВС в НТФ-связывающих белках.

7.2.2.3. ***Межсубъединичные связи кофакторов.*** Молекулу гема можно рассматривать в качестве кофактора, участвующего в переносе зарядов и кислорода. Типичным представителем белков, содержащих гем в своей структуре, являются гемоглобины, структура которых изучена очень подробно [20–22]. В качестве примера в этом разделе мы приведем ССИВС из гемоглобина беспозвоночных — моллюска Scapharca inaequivalvis (файл 1sct [22]). В отличие от многих гемоглобинов позвоночных, являющихся тетрамерами, этот гемоглобин состоит из двух субъединиц. Как и в случае других гемоглобинов, атом железа гема в этом белке связан с имидазольным циклом боковой цепи гистидина (His 101) (рис. 7.11). Однако продолжающаяся далее ССИВС уходит не вглубь белка, как в некоторых других гемоглобинах, а к области контакта со второй субъединицей. Центральной группой, осуществляющей через ССИВС связь двух субъединиц в этом белке, является HN–C=O-группа Asn 100 (выделена жирным шрифтом), атомы водорода которой образуют с водородные связи с HO–C=O-группами пропионатных остатков гемов. Отметим, что если включить в рассмотрение молекулы воды, встроенные в струк-

туру кристалла, то степень разветвленности ССИВС, как и в случае люциферазы, существенно возрастает. По сути, с гемом связана большая часть субъединицы. Это, однако, принципиально не меняет характер связи двух гемов. Данный факт не остался незамеченным авторами этой работы и обсуждается в связи с кооперативными взаимодействиями субъединициц этого белка [22]. Аналогичную взаимосвязь гемов субъединиц C и D программа выявила в структуре деоксигемоглобина человека (4HHB, хотя эта ССИВС значительно сложнее, чем только что рассмотренная). Наличие подобных фактов указывает на реальность участия ССИВС в обеспечении взаимосвязей кофакторов, расположенных в разных субъединицах.

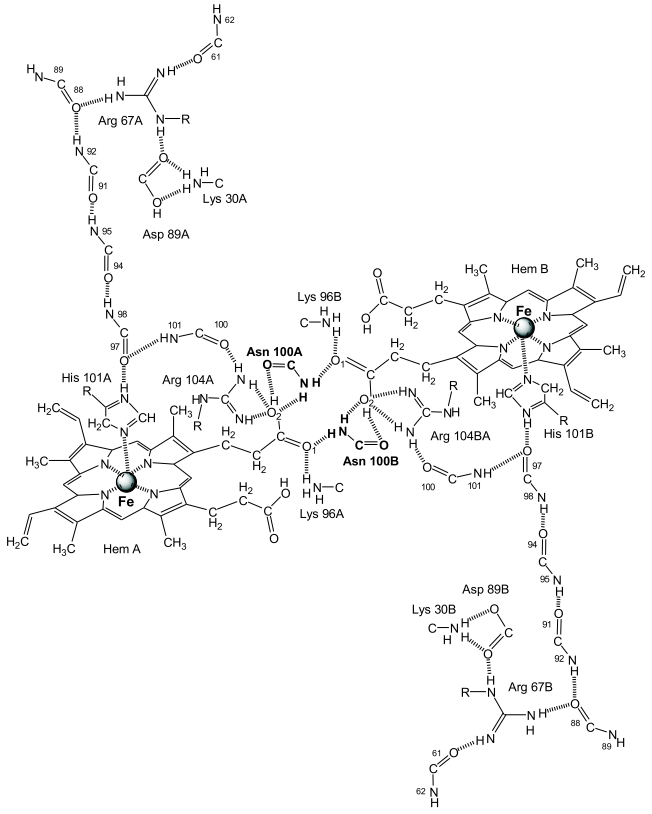


Рис. 7.11. Взаимосвязь гемов через ССИВС в структуре димера гемоглобина моллюска Scapharca inaequivalvis (файл 1sct [22])

7.2.2.4. ***Дополнительность боковых цепей аминокислот различных субъединиц при формировании ССИВС.*** Структура гемоглобинов использована нами для демострации еще одной особенности ССИВС, встречающейся с олигомерных белках, а именно: часть аминокислот, входящих в ССИВС одной субъединицы, предоставляется другой субъедицей. Так, в деоксигемоглобине человека (файл 4hhb [20]) наша программа выявила следующий фрагмент (рис. 7.12).

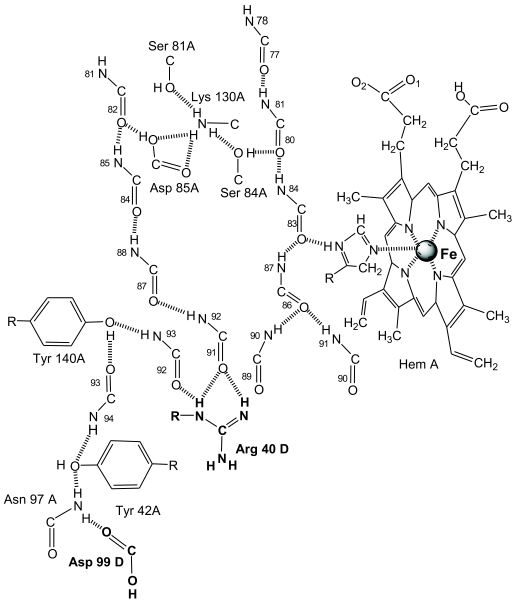


Рис. 7.12. Дополнительность групп из разных субъединиц при построении ССИВС в дезоксигемоглобине человека

Как видно на этом рисунке, включение в ССИВС, связанную с гемом, Tyr 140 и Tyr 42 зависит от присутствия Arg 40, принадлежащего D-субъединице. Если бы этой группировки не было, то фрагмент с двумя тирозинами был бы отключен от данной ССИВС. Следует отметить, что дополнительность боковых цепей аминокислот из разных субъединиц при формировании ССИВС — довольно распространенное явление, с которым мы встретимся в дальнейшем. Мы будем специально на это акцентировать внимание.

7.3. Нуклеиновые кислоты и их комплексы с белками

Как и белки, НК являются цепными информационными биополимерами. Проводя аналогию с белками, азотистые основания, содержащие π-электронные системы, можно рассматривать в качестве аналогов боковых цепей циклических аминокислот, а фосфатные группы (HO–P=O) — аналога пептидной связи (HN–C=O-группы). Остатки рибозы или дезоксирибозы, как мы полагаем, являются изоляторами, но иногда и их C–O-группы также могут участвовать в формировании ССИВС. Можно представить следующие типы основных взаимодействий НК, приводящих к формированию ССИВС:

1. Взаимодействия азотистых оснований между собой: поперек основной цепи (бок о бок); вдоль основной цепи (с участием нижележащего или вышележащего азотистых оснований).

2. Взаимодействия азотистых оснований с белками: с участием основной цепи белка; с участием боковых цепей аминокислот.

3. Взаимодействие фосфатных групп: с участием основной цепи белка; с боковыми цепями аминокислот белка.

Перечисленные типы взаимодействий можно было бы рассматривать как план последующего изложения этих вопросов в нашей книге. Однако, одно их перечисление уже заняло достаточно места. Поэтому мы попытаемся несколько упростить нашу задачу, рассмотрев их в целом, тем более что и в самом деле все варианты взаимосвязаны между собой и порознь практически не встречаются.

Для рассмотрения мы использовали два типа данных: а) результаты изучения структуры модельных комплексов фрагментов НК и узнающих эти фрагменты белков; б) данные по структуре крупных комплексов белков и НК, таких как нуклеосомы. Эти данные, однако, не исключают возможности артефактов, обусловленных особенностями кристаллизации комплексов, и могут отличаться от реальных взаимодействий в живых клетках.

7.3.1. Модельные комплексы фрагментов нуклеиновых кислот и узнающих их белков. К настоящему времени изучено более пятидесяти модельных комплексов. В качестве примеров можно привести ДНК комплексы с белками — регуляторами транскрипции (файлы 2ram [23], 1awc [24], 1mnm [25], 2nll [26]), рестрикционными эндонуклеазами (файлы 1i3j [27], 1rva [28]), Zn-finger пептидами (файлы 1p47 [29], 1a1f [30], 1g2d и 1g2f [31]), модели взаимодействия репрессор-оператор (файлы 1lmb [32], 1trr [33]) и целый ряд других. Разнообразие взаимодействий ДНК и белков достаточно велико и включает все перечисленные выше варианты. Однако детальный анализ позволил сделать следующий вывод: обособленных типов взаимодействий не существует. Нет взаимодействий только азотистых оснований или только боковых цепей с азотистыми основаниями или только фосфатных групп с основной цепью и т. д. Все они, в зависимости от функционального состояния или назначения, так или иначе, присутствуют в этих комплексах. По этой причине мы приведем лишь несколько наиболее ярких примеров, отражающих преимущественно тот или иной тип взаимодействий, полагая, что в клетке они могут вступать и в другие отношения.

7.3.1.1. *ССИВС азотистых оснований.* Из теоретических соображений можно предположить появление таких взаимодействий в двойных спиралях НК, в которых основания уложены в стопку. Образованию таких ССИВС может способствовать искажение «классической структуры» НК под влиянием образования водородных связей с боковыми цепями аминокислот и основной цепью белков. Как показано на рис. 7.13., между цитозинами (C) и гуанинами (G), имеющими противоположное направление нумерации (цепи в спирали, как известно, антипараллельны), в парах можно предположить образование ССИВС: N_2=C–N_1H…O=C–N_1H между C_1, G_1 и N_1=C–N_2H…O_1=C–N_2 между G_2, C_2. Эти ССИВС, очевидно, симметричны. В то же время, для пары A–T возможна лишь одна асимметричная ССИВС: N_2=C–N_1H…O=C–N_1H между A_1 и T_1. Развивая эту мысль, логично предположить образование таких связей между соседними основаниями пар C–G и G–C, а также C–G и T–A. Далее, если, к примеру, пары C–G будут повторяться N раз, то можно ожидать образование блока ССИВС, состоящего из C–G пар.

Предполагаемые блоки, часто осложненные, как и ожидалось, образованием ССИВС с участием белков, а также частичным разрывом водородных связей в парах, действительно обнаруживаются в структуре модельных нуклеопротеидов. Примерами могут служить в комплексы ДНК с эндонуклеазой I (файл 1i3j [27]) — связи G7 цепи B и C45 цепи C, HIN-рекомбиназой (файл 1hcr [34]) — T5 цепи B и A26 цепи C,

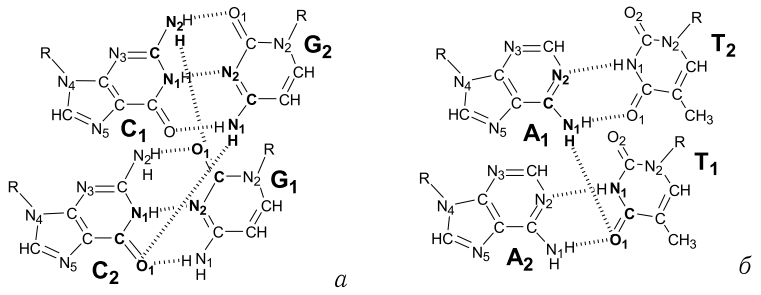


Рис. 7.13. Возможные взаимодействия соседних пар C–G (*а*) и A–T (*б*) азотистых оснований в двойной спирали нуклеиновых кислот

эндонуклеазой ECO RV (файл 1rva [28]) — A 2D и T 10C и целый ряд других. Однако, как мы упоминали во введении к разделу 7.3.1, взаимодействия азотистых оснований в стопках НК являются лишь частью сложно организованных ССИВС НК-белковых комплексов.

7.3.1.2. ***Образование ССИВС азотистых оснований с боковыми цепями аминокислот белков.*** Образование ССИВС с боковыми цепями аминокислот можно наблюдать практически при образовании любого комплекса НК с белком. В качестве модели для анализа НК-белковых взаимодействий часто используется белок Zif-268 (белок А мышей), индуцированный фактором роста нервов (файл 1p47 [29]) и его фрагменты (файл 1a1f [30]), а также белок, узнающий последовательность TATA (файлы 1g2d и 1g2f [31]). В эти комплексы входит цинк, а боковые цепи присоединяются к азотистым основаниям подряд, напоминая пальцы, почему эти белки получили название Zn-finger. Руководящей идеей в этих исследованиях является выяснение «кода узнавания». Слева, на рис. 7.14, *а* показана структура комплекса (файл 1p47 [29]). Видно, что белок, он более темный, располагается в большой борозде фрагмента двойной спирали ДНК. На рис. 7.14, *б* приведена схема ССИВС, построенная на основе одного из Zn-finger фрагментов этого белка. На рисунке видно, что в образовании непрерывных ССИВС, формирующих функциональный блок, участвуют аминокислоты и азотистые основания, а связей между азотистыми основаниями не наблюдается. Следует отметить, что данный фрагмент формирует тандем и в инвертированном виде повторяется еще раз. Мы привели лишь его половину. Короткие ССИВС имеют также комплексы ДНК с белками-репрессорами (1lmb [32], 1trr [33]).

В качестве комментария скажем, что с позиции концепции ССИВС никакого «кода узнавания» нет. В данном примере видно, что имеет место образование комплекса на основе *принципа непрерывности ССИВС*.

Однако приведенный пример не охватывает всего многообразия взаимодействий НК-белки. Совсем иной характер носят эти комплексы с белками-ферментами, осуществляющими расщепление нуклеиновых кислот (эндонуклеазами). На рис. 7.15. *а* показаны ССИВС комплекса ДНК с димерным ферментом эндонуклеазой ECO RV (файл 1rva [28]). Пары азотистых оснований находятся в прямоугольниках, а ССИВС, имеющие, как видно на рисунке, частичную симметрию, располагаются рядом, образуя густую сеть. То, что симметрия лишь частичная, связано с функци-

ональной асимметрией субъединиц в процессе переноса зарядов (см. раздел 5.2.3) и в катализе (см. главу о катализе).

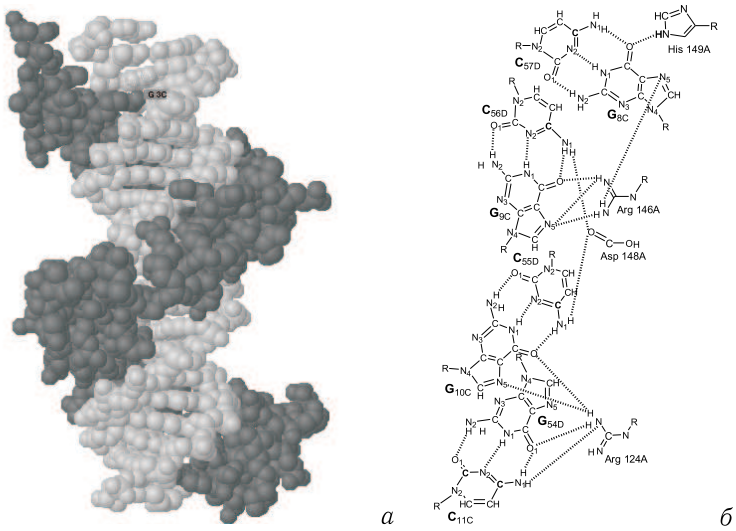


Рис. 7.14. Взаимодействие ДНК с Zn-finger белком (файл 1p47 [29]): *а* — структура комлекса ДНК — Zn-finger белок Zif-268; *б* — ССИВС ДНК и боковых цепей аминокислот белка Zif-268

Детально ССИВС субъединицы B показаны на схеме (рис. 7.15, *б*). Как следует из этой схемы, две пары азотистых оснований связаны между собой через Asn 70A, принадлежащий к субъединице A (пример дополнительности групп в ССИВС). К паре A_{5C} — T_{8D}, как видно на схеме, присоединены также HN–C=O-группа Asn 185A, а также C–OH-группы Thr 188B и Ser 183B. Все они не имеют протяженных ССИВС.

Кроме боковых цепей аминокислот, через HN–C=O-группа 182–183 к парам азотистых оснований подсоединена разветвленная сеть ССИВС, которая включает как системы HN–C=O-групп (справа вверху виден участок с β-структурой, одна из ветвей которой заканчивается Tyr 198B), так и многочисленные боковые цепи аминокислот. В частности, один из участков включает Tyr 219B, Arg 226B, Arg 242B, Asn 227B, Asn 231B, Asn 238B. В нижней части схемы справа заметен фрагмент ССИВС, включающий Asn 188B, HN–C=O-группу 108–107, Lys 173B, Tyr 72B и His 13B.

Интерес предстваляет также факт, что в эти ССИВС включены четыре HO–P=O-группы (с атомами фосфора P_3, P_6, P_7 и P_8). Часть из них (с P_3 и P_6) завершается C–OH-группами серина и дезоксирибозы, а HO–P=O-группа с P_7 участвует в образовании фрагмента ССИВС с тремя расположенными подряд HO–C=O-группами (Asp 90B, Asp 74B, Glu 45B).

Таким образом, на данном примере мы показали, что в формировании комплексов НК и белков могут участвовать практически все группы, способные встраиваться в ССИВС.

7.3.2. Структура ССИВС нуклеосом. Большая часть ДНК клеток высших организмов (эукариот, т. е. имеющих оформленное ядро) находится в ядре не в сво-

бодном состоянии, а в виде хроматина, представляющего собой организованные комплексы ДНК с белками гистонами. Элементарной единицей этих комплексов является нуклеосома, состоящая из палиндрома (последовательности двойной спирали ДНК, имеющей симметрию C_2), состоящего примерно из 140 и более пар оснований,

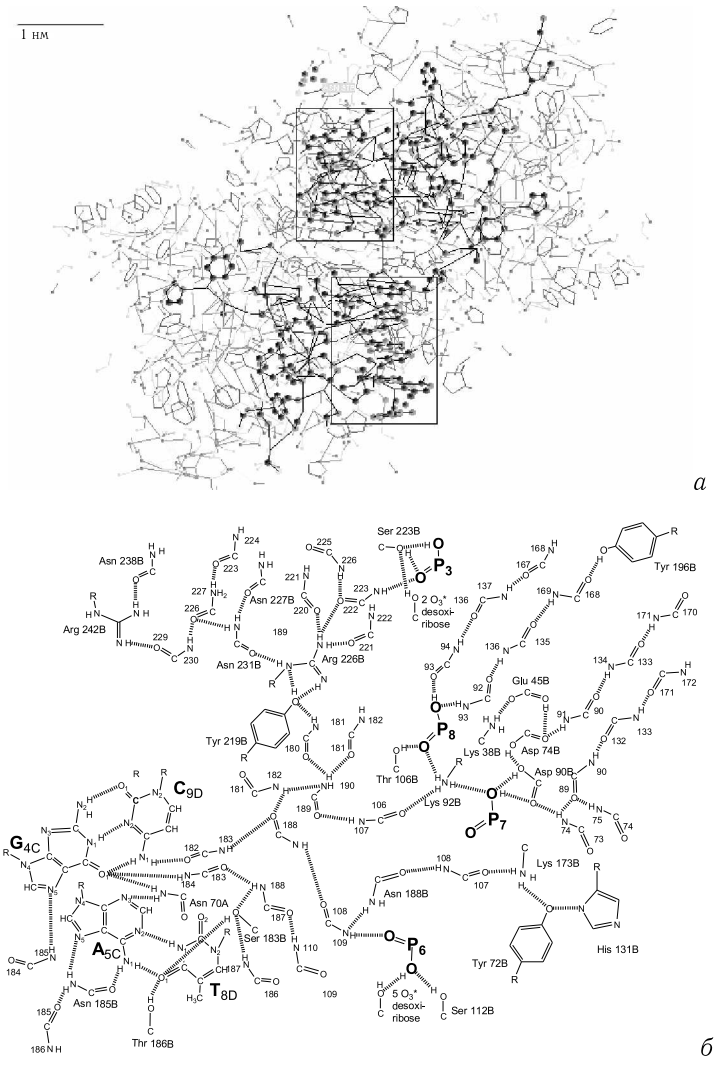
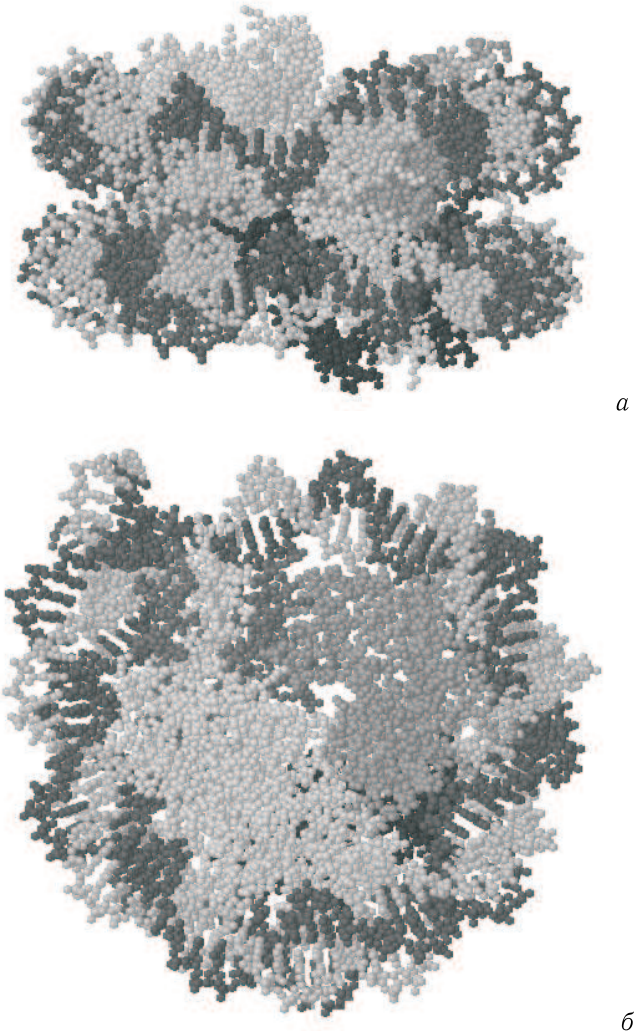


Рис. 7.15. Блок ССИВС комплекса ДНК и эндонуклеазы ECO RV (файл 1rva [28]): *а* — рисунок, полученный программой; вверху — субъединица B, *б* — схема блока ССИВС субъединицы B

и димерного комплекса гистонов, который содержит четыре пары различных белков, образующих интегральное целое. К настоящему времени исследования нуклеосом, ведущиеся уже более 30 лет, привели к получению кристаллов, структура которых расшифрована с разрешением 2,5–1,9 Å(файлы 1m18 и 1m19 [5], 1kx5 [35]). Столь

высокое разрешение позволяет проводить, хотя и с возможными ошибками, анализ ССИВС этих структур.

На рис. 7.16. показан общий вид нуклеосомы, полученный на основе данных



а

б

Рис. 7.16. Общий вид нуклеосомы лягушки Xenopus laevis (файл 1M19): *а* — вид сбоку; *б* — вид с торца

РСА (файл 1m19 [5]). Как видно на рисунке, нуклеосома содержит в своем составе фрагмент ДНК (содержит 147 пар оснований), образующий в два витка (виден на рис. 7.16, *а* как двойной «бублик»), который «намотан» на гистоновый комплекс (кор), заполняющий сердцевину этого «бублика» (рис. 7.16, *б*). Программа PROTEIN 3D выявила следующие особенности структуры этого комплекса (файл 1 м19 [5]).

Во первых, большая часть азотистых оснований ДНК не имеет связи с гистоновым ядром. При этом обнаруживаются блоки пар азотистых оснований, подобные

приведенным на рис. 7.13. Например, такой блок наша программа выявила для пар, начиная с C 89–G 204 и заканчивая C 84–G 209. Связь азотистых оснований с гистонами осуществляется, в основном, с одиночными боковыми цепями. На рис. 7.17, *а* показан пример такой связи аминокислоты аргинина, связывающего, кроме азотистых оснований, также остатки дезоксирибозы.

Во-вторых, основную роль в связи ДНК с гистонами выполняют фосфатные группы и молекулы дезоксирибозы. При этом в комплексах, часто содержащих короткие ССИВС, участвуют боковые цепи аминокислот и HN–C=O-группы разных гистоновых белков. Так на рис. 7.17, *б* показан небольшой блок, в который от ДНК входят три фосфатных группы и C–OH-группа остатка рибозы, от молекулы белка C — два аргинина, а от молекулы белка D — Glu 232, Tyr 237 и две HN–C=O-группы. На рис. 7.17, *в* приведена более протяженная ССИВС с участием с участием α-спирали белка C, 278-й фосфатной группы, а также HN–C=O-групп и боковых цепей (Lys 243, His 246) белка D. В значительной степени наше предсказание относительно формирования ССИВС с участием HO–P=O и HN–C=N групп в ДНК-гистоновых комплексах оправдалось, хотя их состав оказался сложнее.

В-третьих, внутри гистонового ядра белковые молекулы имеют в основном, α-спиральную конформацию. При этом гистоны в комплексе не образуют сильно разветвленных ССИВС. На рис. 7.17, *в* приведен пример ССИВС с участием α-спирального фрагмента, практически почти не имеющего ветвлений.

Сравнительно простое строение ССИВС в структуре нуклеосом, по-видимому, не должно вызывать удивление, поскольку основная роль гистонового кора — удержание на своей поверхности суперспирализованной молекулы ДНК. Оно находится в разительном контрасте со сложнейшей структурой ССИВС в комплексах НК с эндонуклеазами (см., например, рис. 7.14), обеспечивающих процесс расщепления межнуклеотидных связей.

Вероятно, существует определенная зависимость между степенью сложности ССИВС и функциональной ролью, которую они играют в наноструктурах.

7.4. Рекомендации конструктору наноструктур, использующему представления о ССИВС

В заключение второй части данной книги, целиком посвященной развитию концепции ССИВС, выскажем некоторые соображения о том, какие моменты должен учитывать конструктор, работающий над созданием бионических молекулярных функциональных наноструктур.

1. Бионические наноструктры должны представлять собой линейные цепные полимеры, состоящие из отдельных звеньев.

2. В структуру звеньев основной цепи должны входить элементарные резонансные группы, которые могли бы в процессе самоорганизации цепного полимера формировать непрерывные ССИВС.

3. Конструкция отдельной структуры должна состоять из блоков ССИВС, состоящих как из резонансных групп основной цепи, так и простых и резонансных групп боковых цепей звеньев.

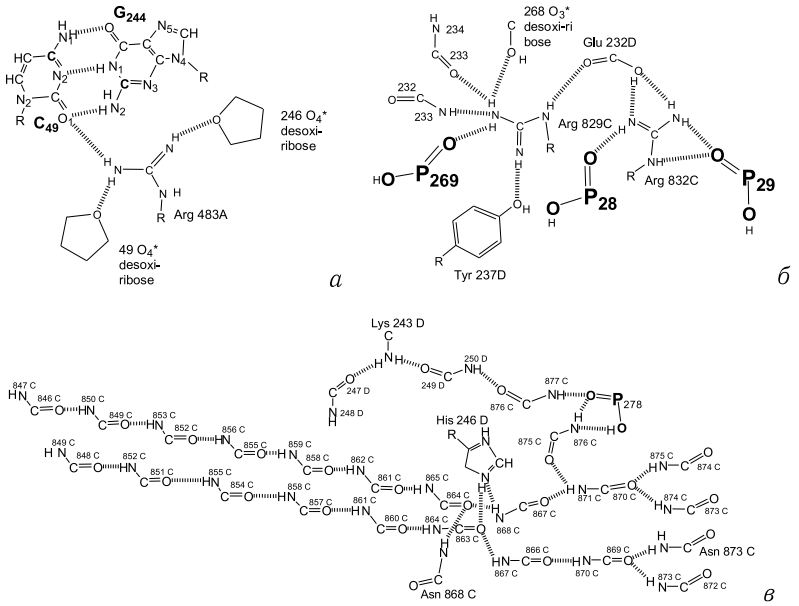


Рис. 7.17. Примеры ССИВС нуклеосомы лягушки Xenopus laevis: *а* — связь азотистых оснований и дезоксирибоз с аргинином; *б* — взаимодействие боковых цепей аминокислот, принадлежащих разным гистонам, с фосфатными группами и дезоксирибозой; *в* — ССИВС с участием α-спирали белка C, HO–P=O-группы 278, а также HN–C=O-групп и боковых цепей (Lys 243, His 246) белка D

4. Структуры должны конструироваться с учетом их реализации в виде олигомеров (димеров, тетрамеров и т. д.) или парных доменов, что обусловлено заложенным механизмом переноса зарядов по ССИВС.

5. Блок ССИВС может занимать как одну, так и несколько субструктур.

6. В состав блоков ССИВС можно включать группы, принадлежащие разным частям надмолекулярного комплекса.

Разумеется, перечисленные рекомендации не могут охватить всего многообразия проблем, связанных с бионическими наноструктурами. Следующая часть книги будет посвящена дальнейшему развертыванию того потенциала, который заключает в себя принцип континуальности ССИВС. Приведенные в ней результаты будут способствовать конкретизации подходов к теоретическому конструированию бионических наноструктур.

Литература к главе 7

1. *Карасев В.А.*, *Стефанов В.Е.*, *Курганов Б.И.* Надмолекулярные биоструктуры: организация, функционирование, происхождение // В кн.: Итоги науки и техники, сер. Биол. химия. Т. 31. — М.: ВИНИТИ, 1989. — 199 с.
2. *Tsukihara T.*, *Shimokata K.*, *Kanayama Y.*, *Shimada H.*, *Muramoto K.*, *Aoyama H.*, *Mochizuki M.*, *Shinzawa-Itoh K.*, *Yamashita E.*, *Yao M.*, *Ishimura Y.*, *Yoshikawa S.* The low-spin heme of cytochrome c oxidase as driving element of the proton-pumping process // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 2003. V. 100. P. 15304–15309.
3. *Gao X.*, *Wen X.*, *Esser L.*, *Quinn B.*, *Yu L.*, *Yu C.-A.*, *Xia D.* Structural basis for the quinine reduction in the bc_1 complex: a comparative analysis of crystal structures of mitochondrial cytochrome bc_1 with bound substrate and inhibitors at the Q_1 site // Biochemistry. 2003. V. 42. P. 9067–9080.
4. *Hazes B.*, *Boodhoo A.*, *Cockle S.A.*, *Read R.J.* Crystal structure of the pertussis toxin-ATP complex: a molecular sensor // J. Mol. Biol. 1996. V. 258. P. 661–671.
5. *Suto R.K.*, *Edayathumangalam R.S.*, *White C.L.*, *Melander C.*, *Gottesfeld J.M.*, *Dervan P.B.*, *Luger K.* Crystal structures of nucleosome core particles in complex with minor groove DNA-binding ligands // J. Mol. Biol. 2003. V. 326. P. 371–380.
6. *Luecke H.*, *Schobert B.*, *Richter H.-T.*, *Cartailler J.-P.*, *Lanyi J.K.* Structure of bacteriorhodopsin at 1.55 Å resolution // J. Mol. Biol. 1999. V. 291. P. 899–911.
7. *Essen L.-O.*, *Siegert R.*, *Lehmann W.D.*, *Oesterhelt D.* Lipid patches in membrane protein oligomers: crystal structure of the bacteriorhodopsin-lipid complex // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1998. V. 95. P. 11673–11678.
8. *Franks N.P.*, *Jenkins A.*, *Conti E.*, *Lieb W.R.*, *Brick P.* Structural basis for the inhibition of firefly luciferase by a general anesthetic // Biophys. J. 1998. V. 75. P. 2205–2211.
9. *Fisher A.J.*, *Thompson T.B.*, *Thoden J.B.*, *Baldwin T.O.*, *Rayment I.* The 1.5 Å resolution crystal structure of bacterial luciferase in low salt condition // J. Biol. Chem. 1996. V. 271. P. 21956–21968.
10. *Moore S.A.*, *James M.N.G.* Common structural features of the luxf protein and the subunits of bacterial luciferase: evidence for a (beta alpha)8 fold in luciferase // Protein Sci. 1994. V. 3. P. 1914–1926.
11. *Naismith J.H.*, *Emmerich C.*, *Habash J.*, *Harrop S.J.*, *Helliwell J.R.*, *Hunter W.N.*, *Raftery J.*, *Kalb A.J.*, *Yariv J.* Refined structure of concanavalin A complexed with alfa-methyl-D-pyranoside at 2.0 Å resolution and comparison with the saccharide-free structure // Acta Crystallogr. Sect. D. 1994. V. 50(9). P. 847–858.
12. *Rizzi M.*, *Nessi C.*, *Mattevi A.*, *Coda A.*, *Bolognesi M.*, *Galizzi A.* Crystal structure of NH3-dependent NAD+ synthetase from Bacillus subtilis // EMBO J. 1996. V. 15(19). P. 5125–5134.
13. *Schulze-Gahmen U.*, *Brandsen J.*, *Jones H.D.*, *Morgan D.O.*, *Meijer L.*, *Vesely J.*, *Kim S.H.* Multiple modes of ligand recognition: crystal structures of cyclin-dependent protein kinase 2 in complex with ATP and two inhibitors, olomoucine and isopentenyladenine // Proteins. 1995. V. 22. P. 378–391.
14. *Wilbanks S.M.*, *McKay D.B.* How potassium affects the activity of the molecular chaperone HSC70. II. Potassium binds specifically in the ATP-ase active site // J. Biol. Chem. 1995. V. 270. P. 2251–2257.
15. *Nassar N.*, *Horn G.*, *Herrmann C.*, *Scherer A.*, *McCormick F.*, *Wittinghofer A.* The 2.2 Å crystal structure of the ras-binding domain of the serine / threonine kinase c-Raf1 in complex with Rap1A and a GTP analogue // Nature. 1995. V. 375. P. 554–560.

16. *Sondek J.*, *Lambright D.G.*, *Noel J.P.*, *Hamm H.E.*, *Sigler P.B.* GTP-ase mechanism of G-proteins from the 1.7 Å crystal structure of transducin alpha-GDP-ALF4 // Nature. 1994. V. 372. P. 220–221.
17. *Карасев В.А.* Генетический код: новые горизонты. — СПб: Тесса, 2003. — 144 с.
18. *Карасев В.А.*, *Лучинин В.В.*, *Стефанов В.Е.* Как построить биочип? // Биотехнология. 1993. № 2. С. 3–15.
19. *Karasev V.A.*, *Luchinin V.V.*, *Stefanov V.E.* A Model of Molecular Electronics Based on the Concept of Conjugated Ionic-Hydrogen Bond Systems // Adv. Mater. Opt. Electron. 1994. V. 4. P. 203–218.
20. *Fermi G.*, *Perutz M.F.*, *Shaanan B.*, *Fourme R.* The crystal structure of human deoxy-haemoglobin at 1.74 Å resolution // J. Mol. Biol. 1984. V. 175. P. 159–174.
21. *Pesce A.*, *Dewilde S.*, *Kiger L.*, *Milani M.*, *Ascenzi P.*, *Marden M.C.*, *Van Hauwaert M.L.*, *Vanfleteren J.*, *Moens L.*, *Bolognesi M.* Very high resolution structure of a trematode hemoglobin displaying a Tyr B10-Tyr E7 heme distal residue pair and high oxygen affinity // J. Mol. Biol. 2001. V. 309. P. 1153–1164.
22. *Royer W.E. Jr.* High-resolution crystallographic analysis of a cooperative dimeric hemoglobin // J. Mol. Biol. 1994. V. 235. P. 657–681.
23. *Chen Y.Q.*, *Ghosh S.*, *Ghosh G.* A novel DNA recognition mode by the NF-kappa B P. 65. homodimer // Nat. Struct. Biol. 1998. V. 5. P. 67–73.
24. *Batchelor A.H.*, *Piper D.E.*, *de la Brousse F.C.*, *Mcknight S.L.*, *Wolberger C.* The structure of GABP alpha / beta: an ETS domain–ankyrin repeat heterodimer bound to DNA // Science. 1998. V. 279. P. 1037–1041.
25. *Tan S.*, *Richmond T.J.* Crystal structure of the yeast MAT-alpha2/MCM1/DNA ternary complex // Nature. 1998. V. 391. P. 660–666.
26. *Rastinejad F.*, *Perlmann T.*, *Evans R.M.*, *Sigler P.B.* Structural determinants of nuclear receptor assembly on DNA direct repeats // Nature. 1995. V. 375. P. 203–211.
27. *Van Roey P.*, *Waddling C.A.*, *Fox K.M.*, *Belfort M.*, *Derbyshire V.* Intertwined structure of the DNA-binding domain of intron endonuclease I-TevI with its substrate // EMBO J.2001. V. 20. P. 3631–3636.
28. *Winkler F.K.*, *Banner D.W.*, *Oefner C.*, *Tsernoglou D.*, *Brown R.S.*, *Heathman S.P.*, *Bryan R.K.*, *Martin P.D.*, *Petratos K.*, *Wilson K.S.* The crystal structure of Eco RV endonuclease and of its complexes with cognate and noncognate DNA fragments // EMBO J. 1993. V. 12. P. 1781–1795.
29. *Peisach E.*, *Pabo C.O.* Constraints for zinc finger linker design as inferred from X-ray crystal structure of tandem Zif268-DNA complexes // J. Mol. Biol. 2003. V. 330. P. 1–7.
30. *Elrod-Erickson M.*, *Benson T.E.*, *Pabo C.O.* High-resolution structures of variant Zif268-DNA complexes: implications for understanding zinc finger-DNA recognition // Structure. 1998. V. 6. P. 451–464.
31. *Wolfe S.A.*, *Grant R.A.*, *Elrod-Erickson M.*, *Pabo C.O.* Beyond the «recognition code»: structures of two Cys2 His2 zinc finger / TATA box complexes // Structure. 2001. V. 9. P. 717–723.
32. *Beamer L.J.*, *Pabo C.O.* Refined 1.8 Å crystal structure of the lambda repressor-operator complex // J. Mol. Biol. 1992. V. 227. P. 177–196.
33. *Lawson C.L.*, *Carey J.* Tandem binding in crystals of a TRP repressor / operator half-site complex // Nature. 1993. V. 366. P. 178–182.
34. *Feng J.-A.*, *Johnson R.C.*, *Dickerson R.E.* Hin recombinase bound to DNA: the origin of specificity in major and minor groove interactions // Science. 1994. V. 263. P. 348–355.
35. *Davey C.A.*, *Sargent D.F.*, *Luger K.*, *Maeder A.W.*, *Richmond T.J.* Solvent mediated interactions in the structure of the nucleosome core particle at 1.9 Å resolution // J. Mol. Biol. 2002. V. 319. P. 1097–1113.

Часть III

ФИЗИЧЕСКО-ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ РЕАЛИЗАЦИИ БИОНИЧЕСКИХ НАНОСИСТЕМ

В этой части книги будут рассмотрены конкретные системы и структуры, воплощающие принципы концепции ССИВС. Эти реализации будут даны в форме моделей: топологического кодирования, катализа, мембранных структур, наносенсорики. В процессе изложения мы будем придерживаться плана хотя и не совсем традиционного, но логически обусловленного объектами изучения. Сначала будет представлена идеологическая основа модели, вытекающая из концепции ССИВС. Затем будет развернута «сама из себя», как это свойственно теоретическому подходу, непосредственно модель, в ее конкретном воплощении. И, наконец, там, где это необходимо и возможно, модель будет сопоставлена с реально существующими объектами. Попутно будет проведен анализ современной литературы и сравнение выводов, вытекающих из моделей, с существующими подходами и представлениями.

Глава 8

МОДЕЛЬ ТОПОЛОГИЧЕСКОГО КОДИРОВАНИЯ ЦЕПНЫХ ПОЛИМЕРОВ

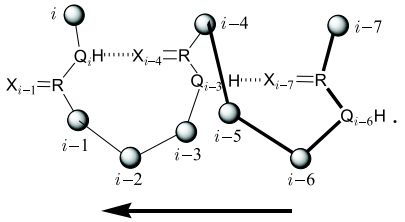
8.1. Принцип непрерывности ССИВС как основа модели топологического кодирования

8.1.1. Механизм самоорганизации наноструктур. Ранее (см. гл. 2) мы рассматривали вопрос о типах межмолекулярных взаимодействий, которые участвуют в формировании надмолекулярной организации наноструктур. Взгляды на ведущую роль того или иного типа взаимодействий, в биоструктурах, неоднократно пересматривались, как в сторону водородных связей [1], так и в сторону неполярных и ван-дер-ваальсовых взаимодействий [2, 3]. Сбалансированной точкой зрения является признание важности всех типов взаимодействий [4, 5].

Тем не менее, природа развития систем предполагает наличие ведущих и ведомых сил в этом процессе. Как мы определили во второй главе, способность полипептидной цепи фиксировать конформацию цепи за счет водородных связей HN–C=O-групп можно назвать свойством связности. Таким же свойством обладает полинулеотидная

цепь и все другие цепные полимеры, содержащие в звеньях группы, способные образовывать непрерывные ССИВС (табл. 6.2). Мы принимаем, что свойство связности является ведущим в процессах самоорганизации цепных полимеров. Необходимым условием формирования ССИВС, как было показано в четвертой главе, является наличие в этих группах атомов, обладающих противоположными свойствами, т. е. протонодоноров и протоноакцепторов.

Предположим, что некий цепной полимер, содержащий в звеньях резонансные группы HQ–R=X, атомы которых обладают упомянутыми свойствами, сформировал фрагмент спиральной структуры (схема 8.1):



(8.1)

В условиях, когда цепь полимера содержит бесконечное число звеньев, содержащих HQ–R=X-группы, такая цепь с неизбежностью сформирует спираль (на схеме 8.1 направление ее формирования задано справа налево), вдоль которой будут проходить непрерывные ССИВС, состоящие из HQ–R=X-групп. Это означает, что способность к самоорганизации, при наличии групп, обладающих противоположными свойствами, изначально заложена в таких цепных полимерах [6, 7]. Важно только, чтобы эти группы имели ограниченное число степеней свободы, и могли поддаваться регулированию, как это имеет место для HN–C=O-групп белков (см. гл. 2).

Если такой полимер будет иметь боковые цепи, размер которых позволит им влиять на стабильность спиралей, как в сторону усиления, так и в сторону разрушения, то в структуре такой спирали появятся дефекты, которые могут менять направление ее фрагментов и способствовать определенной укладке этих фрагментов в третичную структуру. Таким образом, наличие боковых цепей, обладающих различной степенью связности, в сочетании со свойством связности основной цепи само по себе может обеспечить самоорганизацию исходной молекулы полимера. Цепь такого полимера обладает «молекулярной памятью» и при сохранении расположения боковых цепей потенциально может воссоздавать одну и ту же надмолекулярную структуру. Необходимым условием этого является постепенное формирование структуры, которое обеспечивается путем последовательного наращивания длины исходной цепи.

8.1.2. Тиражирование структур как причина появления системы кодирования. Для целей наноэлектроники, а также в живых клетках необходим не один экземпляр удачной структуры, а их массовое тиражирование [6, 7]. Процесс тиражирования — вот основная причина появления системы кодовых отношений. Что для этого необходимо?

Во-первых, нужно иметь описание конформации той исходной структуры, которая путем взаимодействия боковых цепей между собой и с основной цепью приобретет вид функциональной структуры.

Во вторых, это описание должно быть переведено в закодированное описание в виде линейной цепи какого-либо другого функционального полимера, который может служить исходной матрицей, на которой будет храниться эта информация.

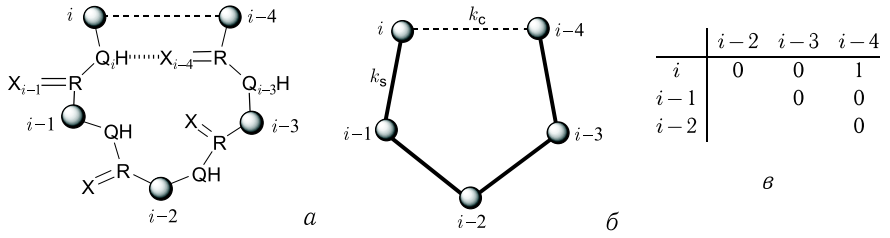
В третьих, с этой матрицы должны сниматься рабочие копии, на которых, через систему молекул-адаптеров строятся молекулы цепного полимера. В процессе синтеза будет воссоздаваться, путем самоорганизации, структура функционального полимера. Эта система обеспечивает тиражирование необходимой структуры.

Боковые цепи полимера при этом должны выполнять двоякую роль. С одной стороны, в процессе синтеза полимера они играют роль физических операторов, воссоздающих закодированную структуру. С другой стороны, в процессе своей работы в структуре, они могут выполнять функции активных элементов в составе ССИВС и пассивных элементов, служащих изолирующей средой для ССИВС.

8.1.3. Элементы системы топологического кодирования. В вопросах тиражирования структур к настоящему времени все более-менее ясно [4]. Конкретно в биосистемах механизм синтеза белка происходит на и-РНК через адаптерные молекулы т-РНК с помощью рибосом. Его обслуживание обеспечивают ферменты копирования и-РНК на матрице ДНК, а также ферменты аминоацил-т-РНК-синтетазы, которые присоединяют аминокислоты к т-РНК (см. раздел 2.3.5). В то же время, в отношении цепных полимеров в целом остается неясным, как закодировать топологию цепного полимера и как эта топология может быть воссоздана самим полимером. На решение этих вопросов направлена модель топологического кодирования цепных полимеров [6–12], которая состоит из трех элементов: *топологического кода*, *алгоритма кодирования и системы физических операторов*. Эта модель подходит только для цепных полимеров, основная цепь которых, а также боковые цепи обладают способностью к формированию непрерывных ССИВС. В рамках модели она называется свойством связности.

8.2. Топологический код

8.2.1.1. *4-х-звенный цепной граф как объект теоретического анализа.* Аналогом цепных полимеров, может служить n-звенный цепной граф [6–12]. В качестве адекватного минимального объекта для анализа был выбран 4-х-звенный фрагмент полимера (рис. 8.1, *а*) и его цепной граф (рис. 8.1, *б*).



	$i-2$	$i-3$	$i-4$
i	0	0	1
$i-1$		0	0
$i-2$			0

в

Рис. 8.1. Четырехзвенный фрагмент цепного полимера (*а*), его граф (*б*) и матричное описание (*в*)

Как показано на рис. 8.1, *б*, в таком графе вершины $(i, i-1, \ldots, i-4)$ соответствуют краям повторяющихся звеньев полимера (рис. 8.1, *а*), а структурные ребра

(прямые линии) — связям, соединяющим края звеньев в цепь. Для описания конформаций полимера нами были введены дополнительно ребра связности (на рис. 8.1, *б* — пунктирная линия), которые соответствуют фиксированным каким-либо образом (на рис. 8.1, *а* — водородной связью) атомам в полимере. Эти ребра соединяют несмежные вершины. Длина структурного ребра соответствует константе k_s и для цепного полимера является постоянной величиной (ее можно принять за 1), а ребра связности — константе k_c, которая может варьировать в пределах 0–$2k_s$. Может существовать несколько констант k_c.

Для матричного описания конформации полимера и цепного графа существенны только ребра связности. Наличие ребра связности мы будем обозначать как «1», а отсутствие ребра — как «0». В применении к показанному 4-х-звенному фрагменту такое описание приведено на рис. 8.1, *в*.

На рис. 8.1, *а* водородная связь двух резонансных групп HQ–R=X, образованная Q_i–X_{i-4} атомами, вследствие жесткости этих групп, фиксирует также i-й и $(i-4)$-й атомы, делая их связными. По этой причине ребро связности соединяет вершины i–$(i-4)$. В матрице им соответствует значение 1. Остальным, несвязным парам атомов и вершин графа в матрице соответствуют значения 0. Наиболее важные конформации цепных полимеров, их графы и матричные описания были даны в работах [6–8, 11] и показаны на рис. 8.2.

Как видно из рис. 8.2, *а*, полностью несвязная конформация описывается матрицей из шести переменных, которые принимают значения, равные нулю. Слоистая конформация (рис. 8.2, *б*) описывается матрицей, содержащей три единицы и три нуля. Спиральная конформация первого типа (рис. 8.2, *в*, аналог спирали 3_{10} в белках) содержит в матричном описании только один ноль (связь i–$(i-4)$). Наконец, спиральная конформация второго типа (рис. 8.2, *г*, аналог α-спирали в белках) матрица состоит только из единиц.

В общем виде матрица, описывающая состояния связности 4-х-звенного графа, показана на схеме 8.2:

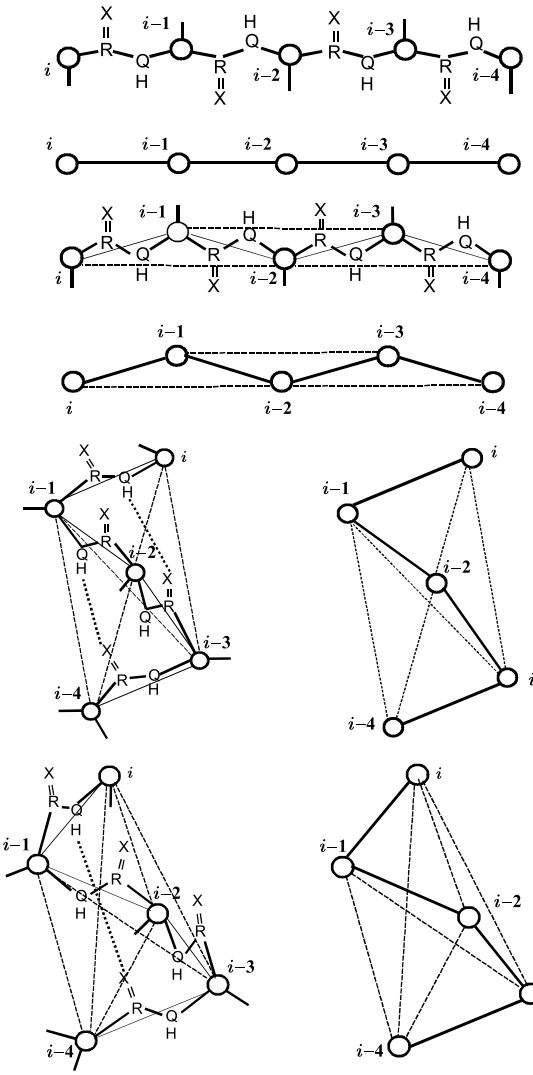
	$i-2$	$i-3$	$i-4$
i	x_1	x_2	x_3
$i-1$		x_4	x_5
$i-2$			x_6

, (8.2)

где $i, i-1, \ldots, i-4$ — вершины графа, x_1, $x_2, \ldots, x_6$ — переменные, принимающие значения 0 или 1. В дальнейшем мы будем использовать также строчную запись следующего вида: $x_1x_2x_3x_4x_5x_6$.

8.2.1.2. ***Принцип построения суперматрицы.*** Нами были рассмотрены все возможные конформации (состояния связности) 4-х-звенного графа, начиная от полностью развернутой, матрица которой состоит из нулей, и заканчивая полностью связной, которая описывается матрицей, состоящей из шести единиц [6–11]. Общее их количество — 64. В упорядоченном виде они представляют собой блочную суперматрицу конформаций 4-х-звенного графа (рис. 8.3).

Элементами этой суперматрицы являются матрицы с тем же порядком описания связей, как и на рисунках 8.1 и 8.2 Как видно на рис. 8.3, *в* суперматрице имеется 4 блока, с общими переменными x_3x_4 (показаны крупными цифрами). Ряды в блоках образованы матрицами с одинаковыми первыми парами переменных (x_1x_2) в последовательности 00, 10, 01, 11, а столбцы — с матрицами, едиными третьими парами



	$i-2$	$i-3$	$i-4$
i	0	0	0
$i-1$		0	0
$i-2$			0

а

	$i-2$	$i-3$	$i-4$
i	1	0	0
$i-1$		1	0
$i-2$			1

б

	$i-2$	$i-3$	$i-4$
i	1	1	0
$i-1$		1	1
$i-2$			1

в

	$i-2$	$i-3$	$i-4$
i	1	1	1
$i-1$		1	1
$i-2$			1

г

Рис. 8.2. Типичные конформации цепных полимеров, их графы и матричные описания: *а* — несвязная; *б* — слоистая; *в*, *г* — спиральные конформации

(x_5x_6), в порядке 00, 01, 10, 11. Полностью несвязный граф, описываемый матрицей с шестью переменными «0», расположился в левом верхнем углу суперматрицы, а граф с полностью связными вершинами, описываемый матрицей с переменными «1» — в правом нижнем углу.

8.2.1.3. ***Симметрия элементов суперматрицы.*** Симметрия элементов суперматрицы анализировалась в работах [8, 10]. В пределах блоков наблюдается два типа симметрии. В соответствии с принципом построения таблицы, графы в блоках и описывающие их матрицы расположены симметрично относительно главных диагоналей. Например, в первом блоке граф, описываемый переменными 100 000 симметричен графу с описанием 000 001. Второй тип симметрии, наблюдаемый в блоках — это

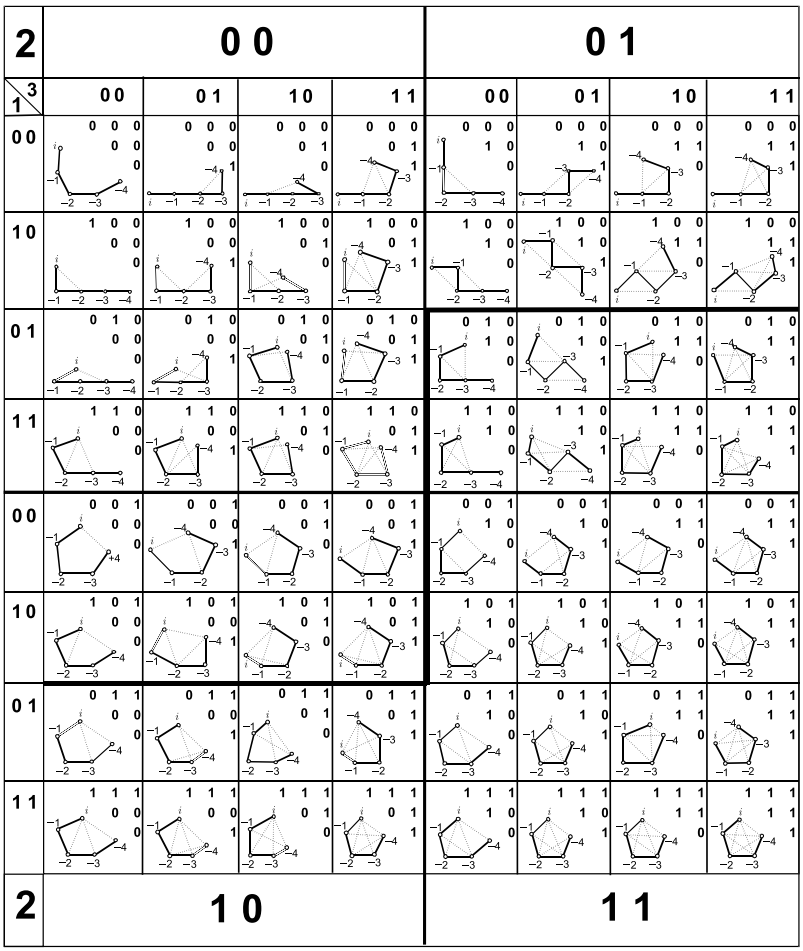


Рис. 8.3. Суперматрица конформаций 4-х-звенного графа и их матричные описания

внутренняя симметрия графов и матриц, расположенных на главных диагоналях. Например, в первом блоке на главной диагонали располагаются графы, описываемые переменными 000 000, 100 001, 010 010, 110 011.

Кроме симметрии внутри блоков можно выделить еще один тип симметрии, имеющей отношение ко всей суперматрице. Она содержит два типа графов и описывающих их матриц, обладающим следующим свойством: 0-переменные в матрицах одной группы соответствуют 1-элементам в матрицах второй группы и наоборот, например, 000 000 $\leftrightarrow$ 111 111, 100 000 $\leftrightarrow$ 011 111, 010 000 $\leftrightarrow$ 101 111 и т. д. Эти две группы графов и матриц разделены жирной линией. В таблице эти графы и матрицы занимают положение, описываемое группой симметрии C_2. Этот тип симметрии можно назвать антисимметрией, а само преобразование $0 \leftrightarrow 1$ можно назвать преобразованием антисимметрии.

8.2.1.4. ***Степень свободы графов, расположенных в блоках.*** Детальный анализ степени свободы графов в отдельных блоках проведен в работах [8, 12]. Напом-

ним, что подвижность точки и вершины на конце стержня имеет степень свободы равную трем, степень свободы внутри звена — равна единице или двум, а внутри жестких фигур, например, тетраэдра, равна нулю.

При рассмотрении суперматрицы (рис. 8.3) было установлено, что общий вид графов, расположенных в блоках и подвижность их структуры, в значительной степени определяется связностью двух пар вершин: i–$(i-4)$ (x_3) и $(i-1)$–$(i-3)$ (x_4). В структуре суперматрицы можно выделить два типа блоков. Если связность вершин i–$(i-4)$ равна 0, то все конформации, входящие в блок, являются ациклическими, открытыми. Это блоки с общими переменными $x_3x_4$00 и 01 (на рис. 8.3 они обозначены крупными цифрами). В то же время, блоки, в которых связность вершин i–$(i-4)$ равна 1, являются замкнутыми, т. е. циклическими (блоки 10 и 11).

Рассмотрим более конкретно каждый из блоков. В блоке 00 присутствуют слабо связные конформации, обладающие наибольшей подвижностью (преобладает степень свободы 2 и 3). Так, первый граф в этом блока, обладает максимальной подвижностью и описывается матрицей с переменными 000 000. Его аналогом в белках является полностью несвязная конформация (рис. 8.2, *а*). Единственный граф, у которого нет степеней свободы, занимает правую нижнюю клетку блока и описывается матрицей с переменными 110 011.

В блоке 01 большая часть графов имеет плоскую конформацию (степень свободы 2–1). Типичным примером такой конформации является граф, описываемый матрицей 100 101, который является аналогом β-структуры белков (рис. 8.2, *б*). Как и в предыдущем блоке, только граф в последней клетке блока (правой нижней), описываемый матрицей 110 111, имеет стабильную конформацию. Он является аналогом спирали 3_{10} (рис. 8.2, *в*). Несмотря на это, мы относим его, как и все графы этих двух блоков, к структурам, имеющим по отношению к связности i–$(i-4)$ вершин, незамкнутую, открытую конформацию.

Блок 10 имеет циклическую конформацию ($x_3 = 1$). Однако, отсутствие связности между вершинами i–$i+4$ ($x_4 = 0$) приводит к тому, что несмотря на замкнутый характер, степень свободы вершин внутри блоков достаточно велика (1 или 2). Только три конформации, описываемые матрицами 111 010, 011 011 и 111 011, являются стабильными. Наконец, блок 11 также содержит замкнутые конформации. Восемь из них является стабильными и занимает последние три колонки и три нижних ряда, за исключением элемента 011 110.

Расположение элементов и графов в таблице таково, что соседние элементы в блоке отличаются друг от друга только на одно значение (один бит информации). Таким образом, данная система напоминает код Грея, в котором различия между соседними элементами минимально [13], что минимизирует ошибки в процессе передачи информации. Однако, приведенное сходство носит формальный характер, поскольку мы имеем дело со структурным описанием связного графа, а не с кодированием. Также нужно иметь в виду, что двумерное расположение элементов в данной суперматрице не отражает всех возможных однобитовых переходов, которое выявляет пространственное представление этой структуры.

8.2.1.5. ***Гиперкуб B^6 как пространственное представление суперматрицы.*** В работах [7, 8, 12] была представлена пространственная структура суперматрицы в форме булева гиперкуба B^6 (рис. 8.4, цветная вклейка). Элементы в этом гиперкубе

связаны между собой однобитовыми переходами. В этой структуре можно выделить следующие особенности, определяемые свойствами гиперкуба B^6 [14].

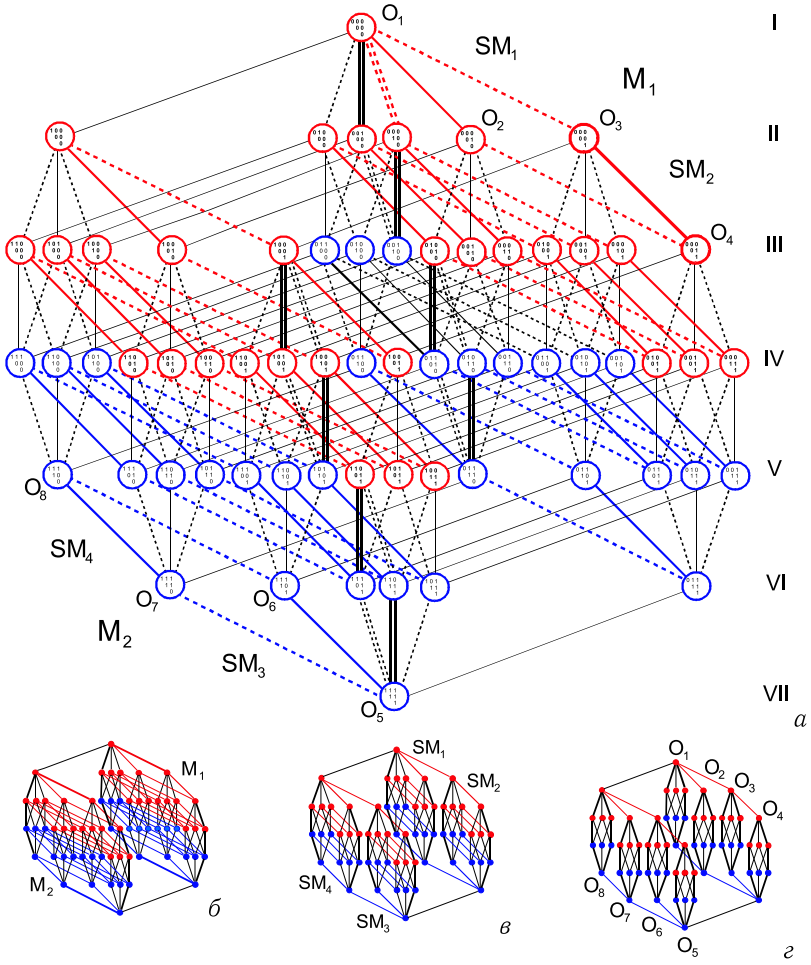


Рис. 8.4. Пространственное представление суперматрицы, описывающей конформации 4-х-звенного графа, в виде булева гиперкуба B^6

1. *Ярусность*. Структура содержит 7 ярусов, отмеченных на рис. 8.4, *а* римскими цифрами. В первом и седьмом ярусах содержится по одной матрице, во втором и шестом — по 6, в третьем и пятом — по 15 и в четвертом — двадцать матриц.

2. *Иерархичность*. Совокупность из 64 матриц распадается на два множества по 32 элемента M_1 и M_2 (рис. 8.4, *б*). В свою очередь, каждое множество содержит по два подмножества: в M_1 — SM_1 и SM_2, а в M_2 — SM_3 и SM_4 (рис. 8.4, *в*). Наконец, каждое подмножество распадается на два октета, общее число которых равно 8 (O_1–O_8, рис. 8.4, *г*).

3. *Связность элементов*. Все матрицы из шести переменных, расположенные в вершинах гиперкуба, связаны между собой единичными (однобитовыми) переходами.

При этом строки блоков 00 и 01 расположены друг над другом в виде квартетов с варьирующими переменными x_5 и x_6 в верхней части множеств M_1 и M_2 (выделены жирным шрифтом в вершинах, обведенных утолщенной линией), а строки блоков 10 и 11 аналогичным образом в нижней части гиперкуба.

4. *Симметрия.* Матрицы, описывающие симметричные графы, расположены в гиперкубе симметрично от вертикальной оси, проведенной через гиперкуб, например, 100 000 и 000 001, 111 000 и 000 111, 111 110 и 011 111. Расположение элементов суперматрицы, связанных преобразованием антисимметрии ($0 \leftrightarrow 1$), описывается группой симметрии C_2, например: матрица 100 000 расположена в гиперкубе слева вверху, а антисимметричная ей матрица 011 111 — справа внизу, аналогично 110 000 и 001 111 и т. д. Элементы, выделенные жирным шрифтом в гиперкубе (в красных кружках) и занимающие верхнюю половину каждого множества, в принадлежат к элементам верхней части суперматрицы, отделенной от нижней жирной линией (см. рис. 8.2). В синих кружках, занимающих нижние половины каждого множества, находятся элементы нижней части суперматрицы.

Следует отметить, что на гиперкубе можно представить и сами конформации графов (рис. 8.5, вклейка 2), что было сделано в работе [8]. Принципиально свойства этой структуры не отличаются формы представления в виде матриц, однако по ней наглядно можно проследить плавные переходы между структурами графов и сопряженные с ними изменения степени их связности. Этот анализ будет проведен нами далее при описании временных меридиональных циклов (см. раздел 8.6.2.2).

8.2.2.1. *Кодирование суперматрицы.* Форма представления информации о структуре графа в виде матриц, состоящих из шести булевых переменных, очевидно, мало подходит для передачи, воспроизведения и тиражирования. По этой причине возникает необходимость в ее перекодировании в пригодную для этих целей линейную цепь [6–12]. Поскольку количество переменных в матрицах, описывающих состояния связности 4-х-звенных цепных графов, равно шести, т. е. три пары, то каждую пару можно обозначить своей буквой, например (схема 8.3):

$$\boldsymbol{x}_1\boldsymbol{x}_2 - \mathrm{X} \qquad \boldsymbol{x}_3\boldsymbol{x}_4 - \mathrm{Y}\boldsymbol{x}_5 \qquad \boldsymbol{x}_6 - \mathrm{Z}. \tag{8.3}$$

В результате образуется триплет XYZ. Каждая пара переменных в триплете может принимать четыре значения (00, 01, 10, 11). Их можно закодировать с помощью 4х-буквенного кода, присвоив каждой паре свою букву (схема 8.4):

$$\mathrm{K} - 00 \qquad \mathrm{L} - 01 \qquad \mathrm{N} - 10 \qquad \mathrm{P} - 11. \tag{8.4}$$

Используя эти соответствия, суперматрица состояний связности была трансформирована в триплетный топологический код, показанный на рис. 7.6. Теперь, в закодированном виде, информация о структуре 4-х-звенных графов будет носить характер одномерной цепи.

8.2.2.2. *Таблица триплетного топологического кода.* В результате трансформации мы получили триплетный топологический код (рис. 8.6). Свойства триплетов в этой таблице сохраняют многие свойства графов. Так, триплеты, расположенные симметрично относительно главных диагоналей блоков, кодируют симметричные конформации графа: первая буква K симметрична третьей букве K (кодирует пару переменных 00), первая буква P симметрична третьей букве P (кодирует пару переменных 11). Однако, первая буква L симметрична третьей букве N ($01 \leftrightarrow 10$), и наоборот.

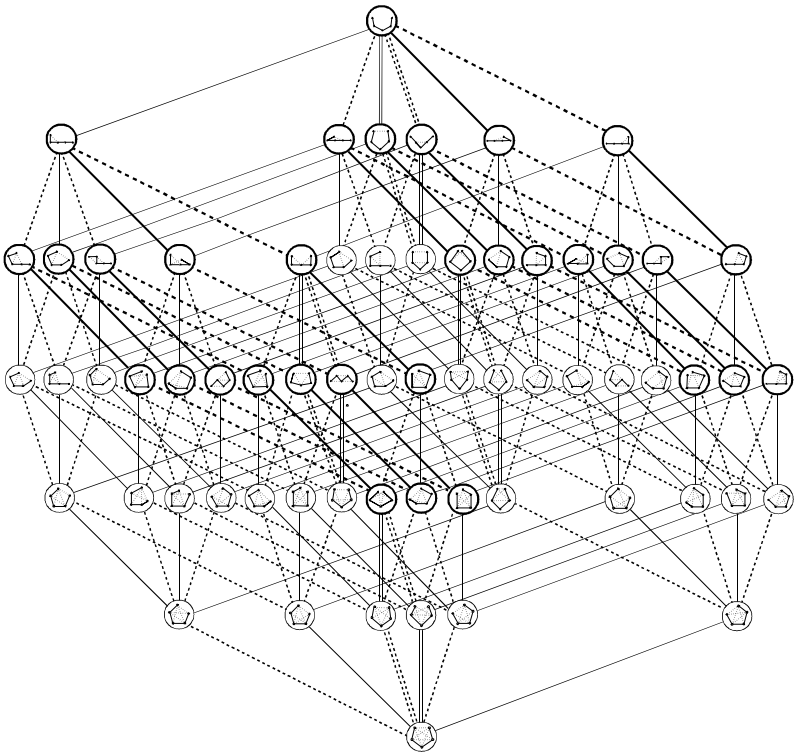


Рис. 8.5. Пространственное представление конформаций 4-х-звенного графа на булевом гиперкубе B^6 (вклейка 2)

Например, для NKK симметричным будет триплет KKN, для PKK — триплет KKP, в то время как NNK симметричен KNL. Триплеты, кодирующие симметричные графы на главной диагонали для первого блока будут выглядеть так: KKK, LKN, NKL, PKP. Триплеты LKL и NKN кодируют не симметричные конформации.

Наибольшую информацию о структуре графов несет вторая буква триплета, которая является единой для всего блока триплетов. Она, кодирует переменные x_3 и x_4, которые, как было рассмотрено в разделе 8.2.1.3, описывают наличие или отсутствие ребер связности между вершинами i–$(i-4)$ и $(i-1)$–$(i-3)$ в каждом блоке. Буквы триплетов, кодирующие антисимметричные пары, т. е. $00 \leftrightarrow 11$, $10 \leftrightarrow 01$, преобразуются по правилу: K $\leftrightarrow$ P и L $\leftrightarrow$ N. При этом антисимметричные триплеты переходят друг в друга, и занимают в топологическом коде положение, описываемое группой симметрии C_2. Они образуют две компактные Г-образные фигуры, разделенные жирной линией.

8.2.2.3. ***Пространственное представление топологического кода в форме булева гиперкуба B^6.*** Как мы показали в разделе 8.2.1.4, пространственным представлением суперматрицы, описывающей конформации 4-х-звенного графа с помощью матриц из шести переменных, является гиперкуб B^6. Пространственным представлением топологического кода, преобразованного из суперматрицы, будет структура, изоморфная булеву гиперкубу B^6 (рис. 8.7). С несколько иными буквенными обозначениями она была рассмотрена нами в работе [8].

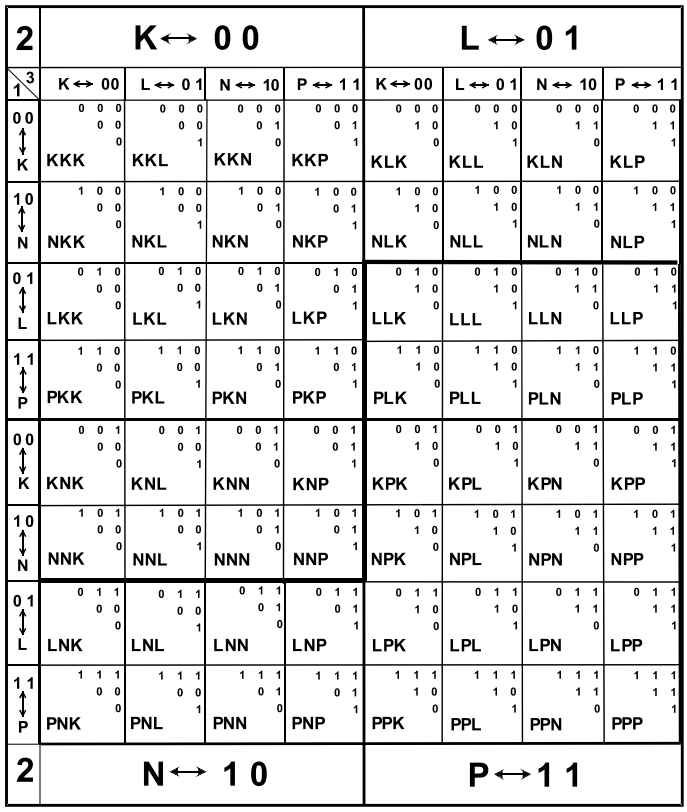


Рис. 8.6. Трансформация суперматрицы состояний связности 4-х-звенного цепного графа в триплетный топологический код

Как следует из рисунка, триплеты с двумя общими неизменными буквами и третьей варьирующей расположились в каждом множестве виде квартетов, друг над другом. При этом квартеты верхней части множеств соответствуют верхней Г-образной фигуре таблицы кода и выделены жирным шрифтом. В данной структуре сохранились все свойства гиперкуба, описанные в разделе 8.2.1.4, в частности, иерархия структур. Симметрия триплетов имеет в гиперкубе те же особенности, что и таблице кода, описанные в разделе 7.2.2.2. Преобразование антисимметрии в гиперкубе осуществляется путем замены букв триплетов по правилу K ↔ P, N ↔ L. Выделенные жирным шрифтом триплеты верхней части гиперкуба, преобразуются на основе этого правила в триплеты нижней половины гиперкуба, занимая поворотно симметричное положение (группа симметрии C_2), например: NKK ↔ LPP, PKK ↔ KPP, PNK ↔ KLP и т. д.

8.3. Алгоритм кодирования n-звенного графа и цепного полимера

Выше были даны закодированные состояния 4-х-звенных фрагментов структуры. Однако нам необходимо кодировать структуру n-звенного графа или цепного поли-

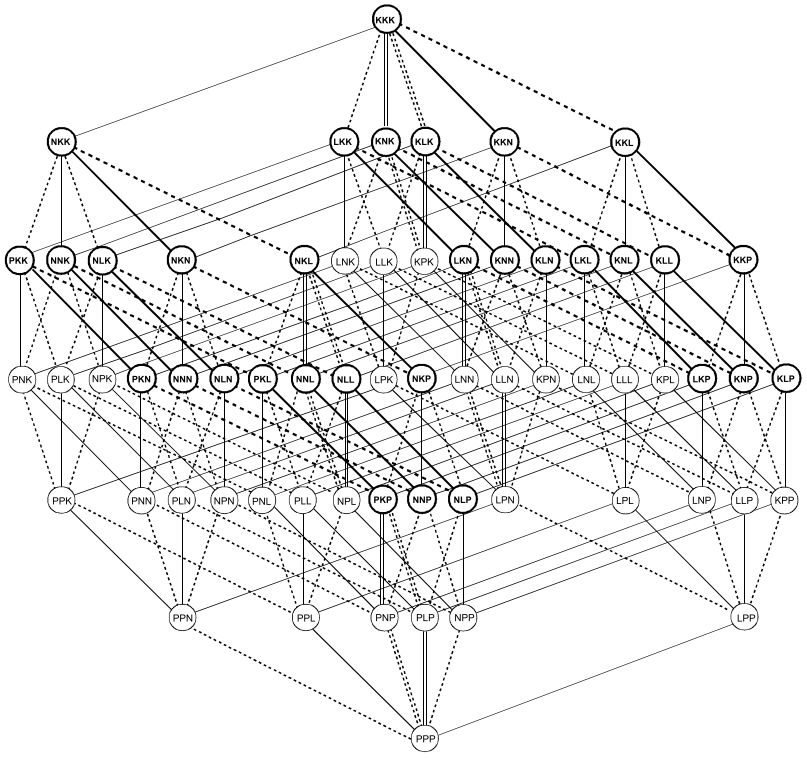


Рис. 8.7. Пространственная структура триплетного топологического кода, изоморфная булеву гиперкубу B^6

мера. Обсуждение этого вопроса, проводившееся в работах [6–11], имеет несколько аспектов. В этом разделе мы рассмотрим их последовательно, с тем, чтобы у читателя была полная ясность относительно того, как был получен тот или иной вывод.

8.3.1. Матрица состояний связности n-звенного графа. В работах [6, 8] была построена полная матрица всех состояний связности n-звенного графа. В связи с изменением алгоритма кодирования (он должен воспроизводить последовательность наращивания цепи полимера), эти матрицы переписаны следующим образом. Переменные y_{ij} могут принимать в матрице значение «1» при наличии ребра связности и «0» — при его отсутствии. Номера столбцов принимают значения от 1 до i справа налево, а номера строк снизу вверх, также от 1 до i (схема 8.5).

Первым нижним индексом в переменных мы обозначим номера строк, например, в 1-й строке y_{1i}, $y_{1(i-1)}$, $y_{1(i-2)}$, $y_{1(i-3)}$, …, y_{14}, y_{13}, y_{12}, y_{11}, и т. д. Эта матрица описывает все состояния связности n-звенного графа.

Однако, для этого описания достаточно использовать верхнюю треугольную матрицу, поскольку переменные, расположенные симметрично относительно главной диагонали, описывают одни и те же состояния. Кроме того, переменные на главной диагонали, описывают состояние связности вершины самой с собой, а расположенные справа от нее — связи двух соседних вершин, являющиеся для данного графа

№	i	$i-1$	$i-2$	$i-3$	$i-4$	…	4	3	2	1	0
i	y_{ii}	$y_{i(i-1)}$	$y_{i(i-2)}$	$y_{i(i-3)}$	$y_{i(i-4)}$	$\cdots$	y_{i4}	y_{i3}	y_{i2}	y_{i1}	y_{i0}
$i-1$	$y_{(i-1)i}$	$y_{(i-1)(i-1)}$	$y_{(i-1)(i-2)}$	$y_{(i-1)(i-3)}$	$y_{(i-1)(i-4)}$	$\cdots$	$y_{(i-1)4}$	$y_{(i-1)3}$	$y_{(i-1)2}$	$y_{(i-1)1}$	$y_{(i-1)0}$
$i-2$	$y_{(i-2)i}$	$y_{(i-2)(i-1)}$	$y_{(i-2)(i-2)}$	$y_{(i-2)(i-3)}$	$y_{(i-2)(i-4)}$	$\cdots$	$y_{(i-2)4}$	$y_{(i-2)3}$	$y_{(i-2)2}$	$y_{(i-2)1}$	$y_{(i-2)0}$
$i-3$	$y_{(i-3)i}$	$y_{(i-3)(i-1)}$	$y_{(i-3)(i-2)}$	$y_{(i-3)(i-3)}$	$y_{(i-3)(i-4)}$	$\cdots$	$y_{(i-3)4}$	$y_{(i-3)3}$	$y_{(i-3)2}$	$y_{(i-3)1}$	$y_{(i-3)0}$
. . . . .											
5	y_{5i}	$y_{5(i-1)}$	$y_{5(i-2)}$	$y_{5(i-3)}$	$y_{5(i-4)}$	$\cdots$	y_{54}	y_{53}	y_{52}	y_{51}	y_{50}
4	y_{4i}	$y_{4(i-1)}$	$y_{4(i-2)}$	$y_{4(i-3)}$	$y_{4(i-4)}$	$\cdots$	y_{44}	y_{43}	y_{42}	y_{41}	y_{40}
3	y_{3i}	$y_{3(i-1)}$	$y_{3(i-2)}$	$y_{3(i-3)}$	$y_{3(i-4)}$	$\cdots$	y_{34}	y_{33}	y_{32}	y_{31}	y_{30}
2	y_{2i}	$y_{2(i-1)}$	$y_{2(i-2)}$	$y_{2(i-3)}$	$y_{2(i-4)}$	$\cdots$	y_{24}	y_{23}	y_{22}	y_{21}	y_{20}
1	y_{1i}	$y_{1(i-1)}$	$y_{1(i-2)}$	$y_{1(i-3)}$	$y_{1(i-4)}$	$\cdots$	y_{14}	y_{13}	y_{12}	y_{11}	y_{10}

(8.5)

постоянными. Перепишем матрицу с учетом сказанного (схема 8.6):

№	$i-2$	$i-3$	$i-4$	…	4	3	2	1	0
i	$\boldsymbol{y}_{i(i-2)}$	$\boldsymbol{y}_{i(i-3)}$	$\boldsymbol{y}_{i(i-4)}$	$\cdots$	y_{i4}	y_{i3}	y_{i2}	y_{i1}	y_{i0}
$i-1$		$\boldsymbol{y}_{(i-1)(i-3)}$	$\boldsymbol{y}_{(i-1)(i-4)}$	$\cdots$	$y_{(i-1)4}$	$y_{(i-1)3}$	$y_{(i-1)2}$	$y_{(i-1)1}$	$y_{(i-1)0}$
$i-2$		$\cdots$	$\boldsymbol{y_{(i-2)(i-4)}}$	$\cdots$	$y_{(i-2)4}$	$y_{(i-2)3}$	$y_{(i-2)2}$	$y_{(i-2)1}$	$y_{(i-2)0}$
. . . . .									
5						$\boldsymbol{y}_{53}$	$\boldsymbol{y}_{52}$	$\boldsymbol{y}_{51}y_{50}$	
4							$\boldsymbol{y}_{42}$	$\boldsymbol{y}_{41}$	$\boldsymbol{y}_{40}$
3								$\boldsymbol{y}_{31}$	$\boldsymbol{y}_{30}$
2									$\boldsymbol{y}_{20}$

(8.6)

На этой матрице переменные $\boldsymbol{y}_{i(i-2)}$, $\boldsymbol{y}_{i(i-3)}$, $\boldsymbol{y}_{i(i-4)}$, в i-й строке, $\boldsymbol{y}_{(i-1)(i-3)}$, $\boldsymbol{y}_{(i-1)(i-4)}$, в $(i-1)$-й и $\boldsymbol{y}_{(i-2)(i-4)}$ в $(i-2)$-й характеризуют состояние 4-х-звенного цепного графа с номером i. Аналогичные переменные в 5-й — 3-й строках можно отнести к описанию 5-го графа и т. д. Иными словами, квазидиагональная матрица из трех переменных (Q-матрица) описывает ближний порядок связности n-звенного графа. Остальные переменные характеризуют дальние взаимодействия. Последующий анализ будет проведен только для Q-матрицы.

8.3.2. Выбор логики и кодирование структуры n-звенного цепного графа. Рассмотрим Q-матрицу состояний n-звенного графа (схема 8.7):

Описание истинных состояний

№	$i-2$	$i-3$	$i-4$	3	2	1	0
i	$\boldsymbol{y}_{i(i-2)}$	$\boldsymbol{y}_{i(i-3)}$	$\boldsymbol{y}_{i(i-4)}$				
$i-1$		$\boldsymbol{y}_{(i-1)(i-3)}$	$\boldsymbol{y}_{(i-1)(i-4)}$				
$i-2$			$\boldsymbol{y}_{(i-2)(i-4)}$				
. . . . .							
5				$\boldsymbol{y}_{53}$	$\boldsymbol{y}_{52}$	$\boldsymbol{y}_{51}$	
4					$\boldsymbol{y}_{42}$	$\boldsymbol{y}_{41}$	$\boldsymbol{y}_{40}$
3						$\boldsymbol{y}_{31}$	$\boldsymbol{y}_{30}$
2							$\boldsymbol{y}_{20}$

(8.7)

Обозначим ее как «описание истинных состояний». Рассмотрим конкретный фрагмент графа, включающий строки со 2-й по 5-ю. В 5-й строке, переменные $(0,1)$ обозначим как $\boldsymbol{y}_{51}$, $\boldsymbol{y}_{52}$, $\boldsymbol{y}_{53}$, в 4-й — $\boldsymbol{y}_{42}$, $\boldsymbol{y}_{41}$, $\boldsymbol{y}_{40}$, в 3-й — $\boldsymbol{y}_{31}\boldsymbol{y}_{30}$, во 2-й — $\boldsymbol{y}_{20}$. В соответствии со схемой 8.2, переменные $\boldsymbol{y}_{51}$, $\boldsymbol{y}_{52}$, $\boldsymbol{y}_{53}$, $\boldsymbol{y}_{42}$, $\boldsymbol{y}_{41}$ и $\boldsymbol{y}_{31}$ можно отнести к описанию 5-го (i-го) 4-х-звенного графа, а $\boldsymbol{y}_{42}$, $\boldsymbol{y}_{41}$, $\boldsymbol{y}_{40}$, $\boldsymbol{y}_{31}$, $\boldsymbol{y}_{30}$, $\boldsymbol{y}_{20}$ — трансляционно сдвинутого на одну строку 4-го $(i-1)$-го графа. При этом, как видно на схеме 8.7, состояния $\boldsymbol{y}_{42}$, $\boldsymbol{y}_{41}$, $\boldsymbol{y}_{31}$ входят в описание как 5-го, так и 4-го (i-го и $(i-1)$-го) графов. Чтобы разделить их описание, примем во внимание, что состояние связности (1) или отсутствие связности (0) может фигурировать без изменений в описаниях состояний как 5-го, так и 4-го графов. Кроме того, состояние связности можно представить как связность и отсутствие связности (1+0) или отсутствие связности и связность (0+1). Эти положения можно записать так (схема 8.8):

$$1+1=1 \qquad 1+0=1 \qquad 0+1=1 \qquad 0+0=0, \tag{8.8}$$

что соответствует таблице истинности для дизъюнкции (логическому «или») [15]. С учетом данных правил разложим Q-матрицу на матрицы состояний связности для 5-го и 4-го графов, так чтобы матрица для 5-го графа была записана жирным шрифтом, а для четвертого — обычным (схема 8.9):

№	ФО	Триплеты	Матрицы				Q-матрица			
5	**Bcd**	$\mathbf{X}_5\mathbf{Y}_5\mathbf{Z}_5$	$\boldsymbol{x}_{53}$	$\boldsymbol{x}_{52}$	$\boldsymbol{x}_{51}$		$\boldsymbol{y}_{53}$	$\boldsymbol{y}_{52}$	$\boldsymbol{y}_{51}$	
4	*Abc*	$X_4Y_4Z_4$		$x_{42}\boldsymbol{x}_{42}$	$x_{41}\boldsymbol{x}_{41}$	x_{40}		$\boldsymbol{y}_{42}$	$\boldsymbol{y}_{41}$	$\boldsymbol{y}_{40}$
					$x_{31}\boldsymbol{x}_{31}$	x_{30}			$\boldsymbol{y}_{31}$	$\boldsymbol{y}_{30}$
						x_{20}				$\boldsymbol{y}_{20}$

(8.9)

Закодируем описания 4-го и 5-го графов из шести переменных в соответствии со схемами 8.3 и 8.4 в виде триплетов: $x_{42}x_{41}=X_4$, $x_{40}x_{31}=\mathrm{Y}_4$, $x_{40}x_{20}=\mathrm{Z}_4$ и $\boldsymbol{x}_{53}\boldsymbol{x}_{52}=\mathbf{X}_5$, $\boldsymbol{x}_{51}\boldsymbol{x}_{42}=\mathbf{Y}_5$, $\boldsymbol{x}_{41}\boldsymbol{x}_{31}=\mathbf{Z}_5$. В результате мы получим описание этого фрагмента в виде двух триплетов $\mathrm{X}_4\mathrm{Y}_4\mathrm{Z}_4$ и $\mathbf{X}_5\mathbf{Y}_5\mathbf{Z}_5$, которое записываем в графе «Триплеты». Если этим триплетам задать соответствия в виде физических операторов (ФО), воссоздающих закодированную триплетами структуру, например, $\mathrm{X}_4\mathrm{Y}_4\mathrm{Z}_4$ — Abc, $\mathbf{X}_5\mathbf{Y}_5\mathbf{Z}_5$ — **Bcd**, то их последовательность запишется в столбце левее триплетов. Еще левее записываются номера закодированных фрагментов графа, триплетов и физических операторов.

Следует отметить, что в процессе кодирования можно использовать и другие типы логики, например коньюнкцию (логическое «и»). Однако, выбор типа логики должен быть обязательно согласован с физическими операторами, иначе может получиться, что при ее воссоздании структура будет иметь вид «с точностью до наоборот».

8.3.3. Общий вид алгоритма «кодирования-декодирования» n-звенного графа. Алгоритм кодирования-декодирования n-звенного графа показан на рис. 8.8. Из рисунка видно, что в процессе кодирования на Q-матрице выделяются последовательно матрицы из шести переменных, которые кодируются, с использованием схем 8.3 и 8.4, в цепь триплетов и на основе соответствий триплет — физический оператор трансформируются в цепь операторов.

В процессе кодирования элементы Q-матрицы характеризуются определенным составом, который был рассмотрен в работах [6–11]. Как видно на рис. 8.8, уже на третьей стадии кодирования, обозначенной индексом 0 (y_{01}, y_{02}, y_{03}) достигается

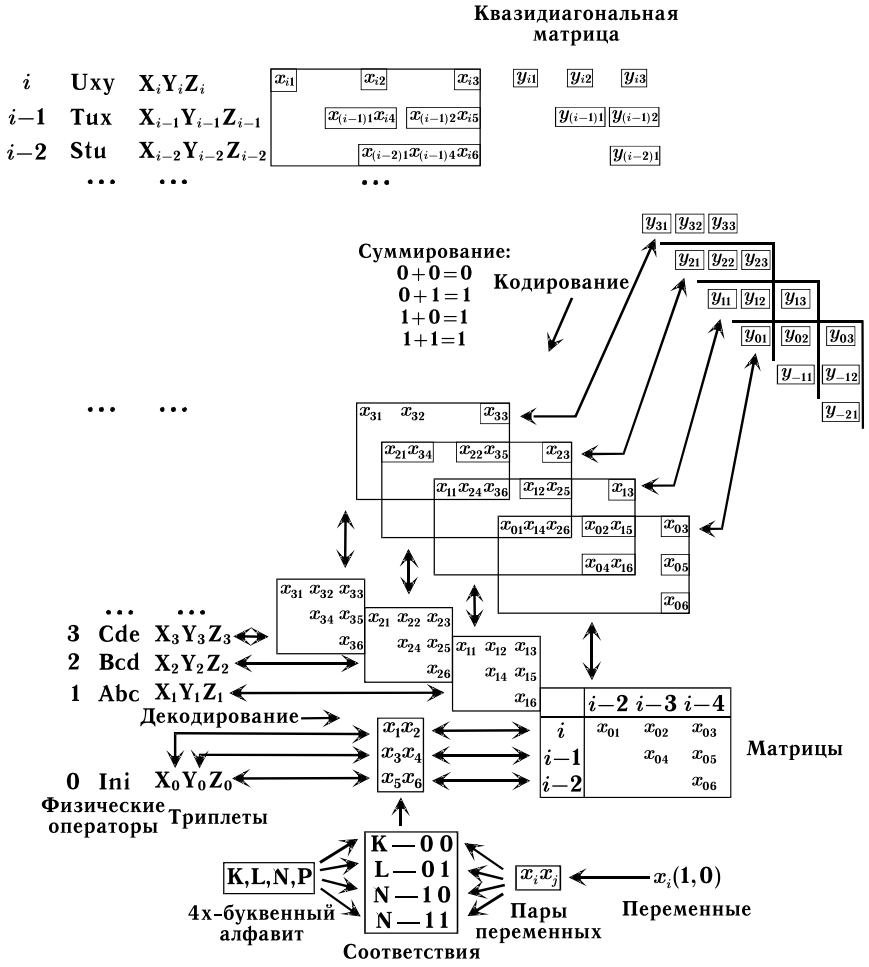


Рис. 8.8. Алгоритм кодирования-декодирования n-звенного графа

постоянный состав переменных, который сохраняется вплоть до $(i-2)$-й стадии (схема 8.10):

№	ФО	Триплет	Матрицы				
i	Uxy	$\mathbf{X}_i\mathbf{Y}_i\mathbf{Z}_i$	$\boldsymbol{x}_{i1}$	$\boldsymbol{x}_{i2}$	$\boldsymbol{x}_{i3}$		
$i-1$	Tux	$\mathbf{X}_{i-1}\mathbf{Y}_{i-1}\mathbf{Z}_{i-1}$		$x_{(i-1)1}\boldsymbol{x}_{i4}$	$x_{(i-1)2}\boldsymbol{x}_{i5}$	$x_{(i-1)2}$	
$i-2$	Stu	$\mathbf{X}_{i-2}\mathbf{Y}_{i-2}\mathbf{Z}_{i-2}$			$\boldsymbol{x}_{(i-2)1}x_{(i-1)4}\boldsymbol{x}_{i6}$	$\boldsymbol{x}_{(i-2)2}x_{(i-1)5}$	$\boldsymbol{x}_{(i-2)3}$
			Q-матрица				
i	Uxy	$\mathbf{X}_i\mathbf{Y}_i\mathbf{Z}_i$	$\boldsymbol{y}_{i1}$	$\boldsymbol{y}_{i2}$	$\boldsymbol{y}_{i3}$		
$i-1$	Tux	$\mathbf{X}_{i-1}\mathbf{Y}_{i-1}\mathbf{Z}_{i-1}$		$\boldsymbol{y}_{(i-1)1}$	$\boldsymbol{y}_{(i-1)2}$	$\boldsymbol{y}_{(i-1)3}$	
$i-2$	Stu	$\mathbf{X}_{i-2}\mathbf{Y}_{i-2}\mathbf{Z}_{i-2}$			$\boldsymbol{y}_{(i-2)1}$	$\boldsymbol{y}_{(i-2)2}$	$\boldsymbol{y}_{(i-2)3}$

(8.10)

В обобщенном виде состав переменных можно записать так (схема 8.11):

$$\boldsymbol{y}_{(i-2)1} = \boldsymbol{x}_{(i-2)1} + x_{(i-1)4} + x_{i6} \qquad \boldsymbol{y}_{(i-2)2} = \boldsymbol{x}_{(i-2)2} + x_{(i-1)5} \qquad \boldsymbol{y}_{(i-2)3} = \boldsymbol{x}_{(i-2)3}. \tag{8.11}$$

Процесс декодирования, как показано стрелками на рис. 8.8, производится в обратном направлении. Триплеты декодируются в матрицы, переменные, на основе логики дизъюнкции, складываются, и в результате получается исходная Q-матрица. Отметим, что, процедура декодирования в алгоритме проводится однозначно, в то время как одна и та же Q-матрица может быть разложена на составляющие множеством способов. Это означает, что одна удачная топология графа может быть использована для кодирования разных по свойствам структур.

8.3.4. Построение структуры n-звенного графа. Для того, чтобы воссоздать декодированную структуру n-звенного графа, введем ряд констант. Зададим условие, что длина структурного ребра есть величина постоянная и обозначим ее как константа k_s. Для ребер связности можно ввести одну или несколько констант, которые будем называть константами ребер связности или просто константами связности — k_c. Угол между двумя структурными ребрами, участвующими в образовании треугольника связности (третья сторона — ребро связности) будем обозначать α. Для графа k_c может быть в пределах от 0 до $2k_s$. В последнем случае граф будет прямой цепью, для которой связность отсутствует. Как частный случай можно рассматривать построение графа из прямоугольных треугольников (угол $\alpha = 90°$), когда $k_c = \sqrt{2} = 1{,}41\ldots$ В общем случае $k_c = 2k_l \cdot \sin(\alpha/2)$. Используя параметры k_s и k_c, можно с помощью компьютерной программы воссоздать структуру n-звенного цепного графа. Следуя нашей логике, эта структура и будет воссоздавать закодированную исходную топологию цепного полимера.

8.4. Физические операторы и их соответствие триплетам топологического кода

8.4.1. Введение понятия «физический оператор». Идея воссоздания закодированной структуры целиком базируется на способности цепного полимера к самоорганизации и формированию непрерывных ССИВС (раздел 8.1.1). Этот вопрос был подробно проанализирован в работах [8–11]. Согласно этим работам, боковые цепи полимера могут выступать в роли регуляторов самоорганизации, способствуя или препятствуя формированию спиральных структур.

Для воссоздания закодированной структуры графа цепным полимером, необходимо, чтобы между кодирующим триплетом и физическим оператором, воссоздающим закодированную структуру, существовало определенное соответствие. Как показано на рис. 8.9, *а*, цепь полимера, наделенная свойством связности, образует 4-х-звенный цикл, фиксированный водородной связью групп X_{i-1}=R–Q_iH…X_{i-4}=R–Q_{i-3}H(показана стрелкой). Описание конформации этого цикла, как и ранее (схема 8.2), осуществляется с помощью матрицы из шести переменных (на рис. 8.9, *а* — справа), причем наиболее существенной для его формирования является связность i-й и $(i-4)$-й вершин, описываемая переменной $\boldsymbol{x}_3$ (выделена жирным шрифтом).

Кроме упомянутой водородной связи, другие группы в формировании замкнутого цикла не участвуют. Таким образом, единственной областью приложения действия физических операторов может быть именно эта связь.

В зависимости от оказываемого эффекта мы выделяем два типа таких операторов: связности и анти-связности (рисунки 8.9, *б* и 8.9, *в*).

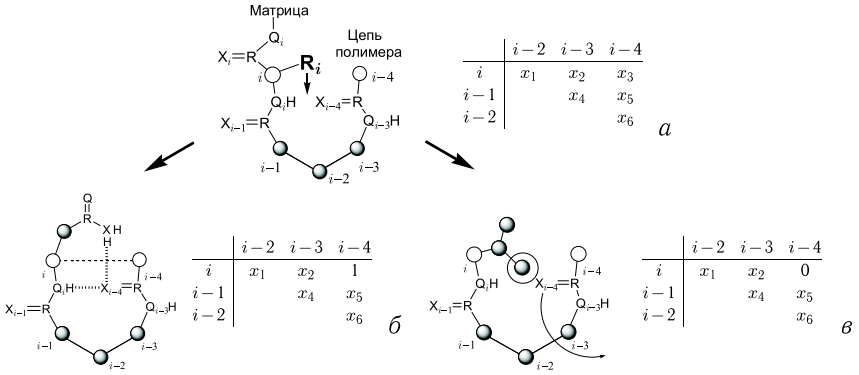


Рис. 8.9. Введение понятия «физический оператор»: *а* — область действия физического оператора; *б* — оператор связности; *в* — оператор антисвязности

Операторы связности — это такие боковые цепи полимера, которые обеспечивают дополнительную фиксацию 4-х-звенного фрагмента (например, за счет водородных связей) в соответствии с закодированным фрагментом цепного графа. Для реализации этой функции они должны иметь оптимальную структуру, а именно: боковая цепь должна иметь на конце группы, способные к образованию водородных связей. Обобщенный вид оператора связности показан на рис. 8.9, *б*. Переменная $\boldsymbol{x}_3$ в матрице равна 1.

Операторы анти-связности — это боковые цепи полимера, которые препятствуют формированию замкнутого 4-х-звенного цикла, действуя в соответствии с закодированным фрагментом цепного графа. Боковые цепи операторов анти-связности должны вклиниваться в область водородной связи основной цепи и не допускать образования водородной связи в этой области (см. рис. 8.9, *в*). Переменная $\boldsymbol{x}_3$ в матрице принимает значение, равное 0.

8.4.2. Общие требования к структуре физических операторов. Исходя из введенного определения понятия «физический оператор» нетрудно сформулировать общие требования к структуре, которой должны обладать эти операторы.

Все физические операторы должны быть одной стерео конфигурации (т. е. быть хирально чистыми). В процессе работы оператор должен быть всегда направлен в сторону той области, на которую он действует, т. е. на связь $Q_iH\ldots X_{i-4}{=}R{-}Q_{i-3}H$. Если операторы будут разного типа (т. е. D и L), то часть операторов будет направлено в нужную сторону, а другая часть — нет, и структура цепного полимера не будет правильно воссоздана.

Физические операторы должны быть ретро-операторами. Поскольку операторы воссоздают конформацию уже синтезированной структуры и направлены назад, на эту структуру, то по своему действию они являются ретро-операторами.

Размеров операторов должен быть сопоставим с областью, на которую они действуют. Поскольку операторы действует в пределах области связи $Q_iH\ldots$ $\ldots X_{i-4}{=}R_{i-4}$, то их размер **не должен** быть существенно больше, чем параметры

этой связи. В противном случае они не будут выполнять свою функцию по воссозданию закодированной структуры.

8.4.3. Соответствие операторов связности и антисвязности блокам триплетов топологического кода. Как было рассмотрено в разделе 8.2.1.4, в суперматрице топологического кода существует два типа блоков структур: блоки с ациклическими 4-х-звенными структурами, в описывающие их матрицы которых входит переменная $\boldsymbol{x}_3 = 0$ (это блоки 00 и 01) и блоки с циклическими конформациями графа, для которых $\boldsymbol{x}_3 = 1$ (блоки 10 и 11). Поскольку, групповым свойством операторов антисвязности является воссоздание открытых конформаций графа, то они должны групповые быть приписаны к блокам 00 и 01. В то же время, общим свойством операторов связности является воссоздание циклических конформаций, поэтому они должны соответствовать блокам 10 и 11. Если принять во внимание порядок соответствия упомянутых переменных буквам триплетов (схема 8.4), то для триплетного топологического кода (рис. 8.6) блокам триплетов, содержащим во втором положении с K и L (K = 00, L = 01), должны соответствовать операторы антисвязности, а блокам N и P (N = 10, P = 11) — операторы связности. Для наглядности это положение показано на рис. 8.10. Операторы связности соответствуют блокам триплетов, кодирующим циклические конформации графа (заштрихованы), а операторы антисвязности — блокам, кодирующим ациклические конформации.

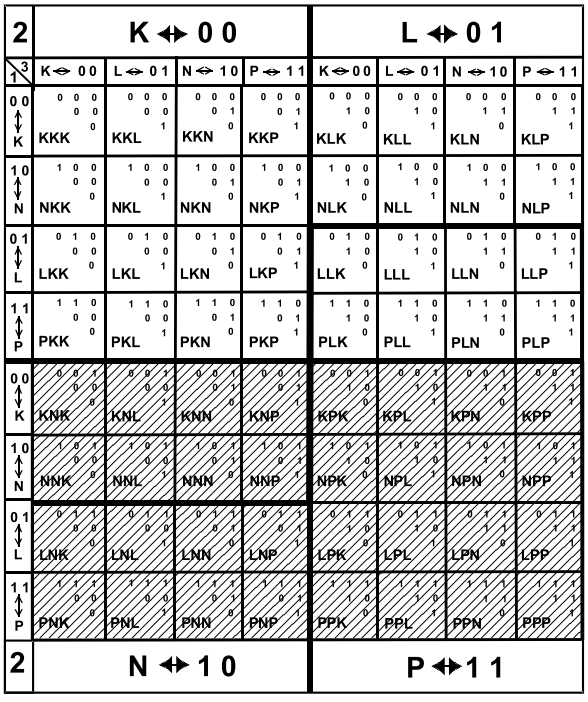
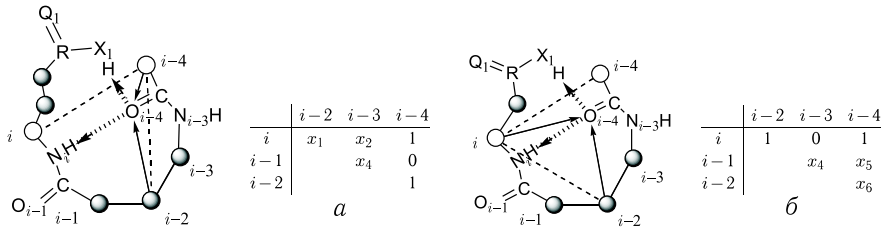


Рис. 8.10. Соответствие физических операторов блокам триплетов топологического кода (пояснения в тексте)

8.4.4. Воссоздание симметричных конформаций физическими операторами. В разделе 8.2.1.3 было показано, что симметричные конформации графов и описывающие их матрицы расположены внутри блоков симметрично относительно их главных диагоналей. Это вытекает из принципов построения суперматрицы. Рассмотрим, какие физические операторы должны воссоздавать эти конформации. Предположим, что это будут операторы связности (рис. 8.11). Как показано на рис. 8.11, *а*, оператор связности имеет тянущее усилие влево вверх, в результате чего разложение сил будет приводить к связности атомов $(i-2)$–$(i-4)$ (показано пунктиром), что описывается соответствующей матрицей справа. На рис. 8.11, *б* другой оператор,



	$i-2$	$i-3$	$i-4$
i	x_1	x_2	1
$i-1$		x_4	0
$i-2$			1

а

	$i-2$	$i-3$	$i-4$
i	1	0	1
$i-1$		x_4	x_5
$i-2$			x_6

б

Рис. 8.11. Соответствия физических операторов триплетам, кодирующим симметричные конформации графа

сходный по структуре функциональной группировке, но имеющий меньшую длину цепи, имеет тянущее усилие, направленное вправо вверх, что приводит к связности атомов i–$i-2$. Это также описывается матрицей (справа рис. 8.11, *б*). Сравнение этих матриц показывает, что они описывают симметричные конформации. Таким образом, для воссоздания симметричных конформаций необходимы разные по длине физические операторы. При этом функциональные группы могут быть как сходные, так и различные. С учетом проведенного обсуждения, на рис. 8.12 показано, как должны быть расположены физические операторы, воссоздающие симметричные конформации. Из рисунка следует, что в каждом блоке триплетам, кодирующим симметричные конформации (они расположены симметрично относительно главных диагоналей), соответствуют разные физические операторы (заштрихованные и не заштрихованные клетки).

Обратим ваше внимание на то, что близкие по структуре, но разные по длине физические операторы связности могут формировать разные области связности в структуре полимера. Это послужило отправной точкой для дальнейшего рассмотрения вопроса о построении системы физических операторов (канонического набора) в рамках модели молекулярной векторной машины.

8.5. Молекулярная векторная машина

Как и предыдущие представления, модель «молекулярной векторной машины» (МВМ) является теоретической абстракцией, возникшей из потребностей разобраться в природе механизмов белковой самоорганизации и канонического набора аминокислот [16–20]. Эти механизмы носят общий характер, поэтому модели применена ко всем цепным полимерам.

Из предыдущего раздела следует, что 64 конформации 4-х-звенного фрагмента цепного полимера должны иметь для их воссоздания соответствующие физические

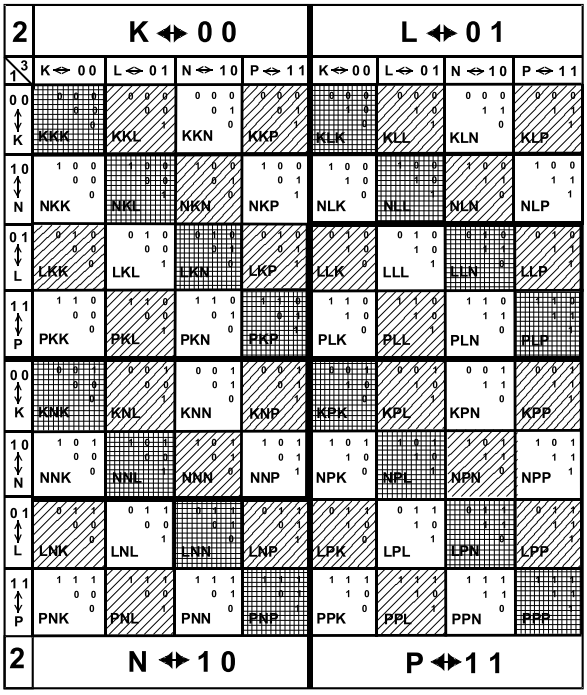


Рис. 8.12. Соответствие физических операторов триплетам, кодирующим симметричные конформации графа (пояснения в тексте)

операторы. С учетом выделения хотя бы двух триплетов для обозначения конца цепи, этих операторов должно быть порядка 62. Однако, на наш взгляд, это несколько многовато. По этой причине нами разработана более экономная, двухъярусная модель МВМ, в которой количество физических операторов равно двадцати, а все разнообразие направлений обеспечивается за счет свойств терминальных группа физических операторов.

8.5.1.1. ***Выделение плоскостей и векторов в области*** $\mathbf{Q_iH\ldots X_{i-4}{=}R_{i-4}}$***-связи.*** Рассмотрим более детально область связи $Q_iH\ldots X_{i-4}{=}R_{i-4}$ (рис. 8.13). Как и ранее, вместо конкретных атомов (N, O, S, C) будем писать обозначения типа Q, R, X, с индексами. В вершинах звеньев, как правило, будут α-атомы элемента R, способного формировать тетраэдрическую структуру связей (углерода, кремния, германия и др.), к которым прикрепляются боковые цепи полимера. Мы будем обозначать их как R^{α} с индексами. Примем во внимание, что $HX_i{-}R_i{=}Q_i$-группы в цепных полимерах могут иметь частично делокализованную двойную связь, за счет чего эта группа, (например пептидная группа в белках) является плоской [21]. Ввиду частичной делокализации, электронное окружение связи $HX_i{-}R_i{=}Q_i$-группы может быть описано в виде трех sp2-гибридизованных облаков (на атомах X_i, R_i и Q_i). На рис. 8.13 *а* показано одно из таких облаков для атома X_{i-4}.

Через связь $Q_iH\ldots X_{i-4}{=}R_{i-4}$ можно провести три взаимно перпендикулярных плоскости (рис. 8.13 *а*). Плоскость I проходит через эту связь перпендикулярно плоскости листа, в результате чего каждое из лопастей sp2-гибридизованного облака

будет находиться симметрично по разные стороны от атома X_{i-4}. Плоскость II проходит параллельно плоскости листа (перпендикулярно плоскости I) и разделяет sp2-гибридизованное облако на две симметричные половины — переднюю и заднюю. Плоскость III, перпендикулярна двум предыдущим и разделяет каждую из лопастей sp2-гибридизованного облака на две половины — верхнюю и нижнюю.

Рассмотрим направления, в которых действуют на эту связь физические операторы, (рис. 8.13, *б–г*), называя эти направления векторами действия или просто векторами, и обозначая стрелками. В пределах плоскости I возможно два варианта векторов действия на водородную связь — вдоль связи $Q_iH\ldots X_{i-4}{=}R_{i-4}$ и перпендикулярно ей (рис. 8.13, *б*). В при действии в направлении вдоль этой связи возможно два вектора. Вектор, направленный в сторону атома Q_i (стрелка вверх), будет способствовать сохранению водородной связи. В то же время, симметричный вектор, направленный в сторону атома X_{i-4} (стрелка вниз) направлен на разрыв водородной связи. В случае действия векторов перпендикулярно связи $Q_iH\ldots X_{i-4}{=}R_{i-4}$ (рис. 8.13, *б*) оба вектора ориентированы в противоположные стороны (симметричны) и направлены на разрыв водородной связи.

По отношению к плоскости II возможны две пары симметричных векторов, направленных вправо и влево вверх от плоскости I в сторону атома Q_i, над плоскостью III и, после вращения вокруг плоскости III, четыре вектора под плоскостью III направлены вниз, в сторону атома X_{i-4} (рис. 8.13, *в*). Наконец, возможен еще один вариант действия векторов, направленных под меньшим углом по отношению к плоскости III (рис. 8.13, *г*). Две пары симметричных векторов справа и слева от плоскости I и спереди и сзади от плоскости II, направлены вправо и влево, а еще две симметричные пары направлены аналогично под плоскостью III. Эти вектора занимают положение, близкое к экваториальному. Таким образом, анализ области $Q_iH\ldots X_{i-4}{=}R_{i-4}$-связи позволил выявить, по крайней мере, 20 векторов действия (или просто векторов), связанных преобразованиями симметрии, которые могут быть воссозданы с помощью 20-ти физических операторов.

8.5.1.2. ***Задание направлений векторов с помощью пространственных фигур.*** Двадцать направлений векторов можно задать с большей определенность с помощью какой-либо пространственной фигуры. Наиболее подходящей для этих целей оказалась структура додекаэдра, имеющего 20 вершин. В центре додекаэдра мы поместили атом X_{i-4}, в одной из вершин — в атом Q_i, а вектора направили в вершины додекаэдра (рис. 8.14, *а*). При этом было сохранено разделение области $Q_iH\ldots X_{i-4}{=}R_{i-4}$-связи тремя плоскостями, что обеспечило сохранение принципов симметрии в положении векторов, а размеры додекаэдра определились исходя из параметров 4-х-звенного фрагмента полимера. Для того, чтобы задать вектор, необходимо знать положение двух точек — начальной точки, из которой исходит вектор, и конечной, куда он направлен. В нашем случае за начальную точку всех векторов можно принять центр додекаэдра, а конечными точками будут вершины додекаэдра. Для этих вершин мы ввели следующие обозначения (рис. 8.14, *б*). В плоскости I вершина, в которой расположен атом Q_i, обозначена буквой A, а симметричная ей и находящаяся под плоскостью III вершина — как (–A). Для двух других вершин, расположенных в плоскости I, в которые направлены вектора, перпендикулярные первым двум (на рис. 8.14, а они не видны), мы использовали обозначения B и (–B). Вершины, симметричные относительно плоскости I были

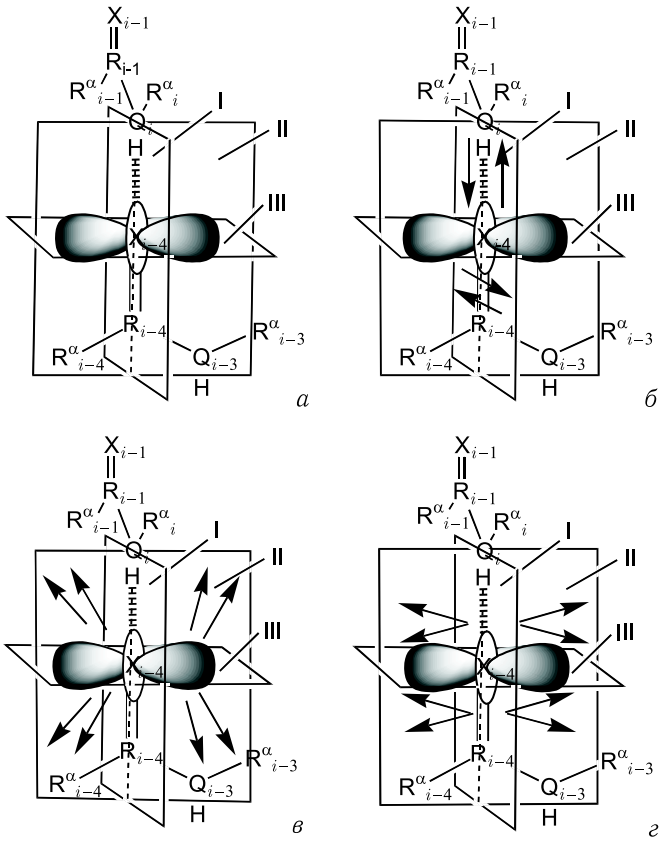


Рис. 8.13. Введение плоскостей симметрии (*а*) и анализ возможных направлений действия физических операторов в области $Q_iH\ldots X_{i-4}{=}R_{i-4}$-связи (*б–г*)

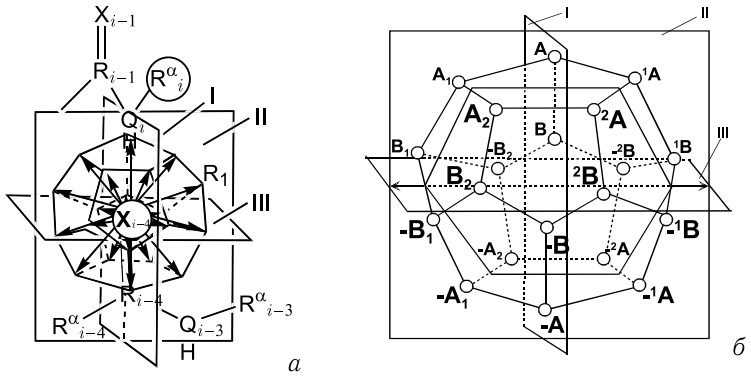


Рис. 8.14. Задание направлений векторов с помощью додекаэдра (*а*) и обозначение вершин додекаэдра (*б*)

обозначены так: слева все буквы, обозначающие вершины имеют индекс справа внизу, а справа — индекс слева вверху. Так, ближние к A вершины, находящиеся за плоскостью II обозначены как A_1 и ^1A, а более отдаленные, расположенные перед плоскостью II, — как A_2 и ^2A. Для вершин, расположенных под плоскостью III, эти обозначения будут, соответственно как $-A_1$, $-^1A$ (перед плоскостью II), и $-A_2$, $-^2A$ (за плоскостью II).

Аналогичным образом обозначены вершины для второй группы из восьми векторов. Вершины, расположенные ближе к вершине B, за плоскостью II обозначены как ^1B и B_1, а вершины перед плоскостью II — как ^2B и B_2, а по отношению к вершине $-B$, соответственно как $-^1B$ и $-B_1$ перед плоскостью II и $-^2B$ и $-B_2$ за плоскостью II. Таким образом, все 20 вершин, в которые направлены выделенные 20 векторов, получили свои наименования.

Практически у нас все готово, чтобы ввести представление о МВМ, которая изображена на рис. 8.15. Как видно на этом рисунке, к плоскостям, разделяющим область $Q_iH\ldots X_{i-4}{=}R_{i-4}$-связи, и додекаэдру с обозначениями вершин (рис. 8.14, *а* и 8.14, *б*), добавились лишь стрелка с буквой S_i, обозначающая сменяемый физический оператор, и фрагмент $i+1$-го звена со стрелкой, указывающей направление на $i+1$-й R^α атом.

В целом исходная МВМ состоит из трех элементов:

— додекаэдра, содержащего группу из 20 векторов действия — радиусов додекаэдра;

— канонического набора сменяемых физических операторов;

— тетраэдрического $R^\alpha{}_i$-го атома, к которому прикрепляются физические операторы и который задает направление растущей цепи полимера.

Рассмотрим детально, свойства каждого из этих элементов МВМ.

8.5.2.1. ***Преобразования симметрии.*** В результате переноса додекаэдра в область $Q_iH\ldots X_{i-4}{=}R_{i-4}$-связи вектора, выделенные в этой области, оказались радиусами додекаэдра, исходящими из центра, в который помещен X_{i-4} атом, и направленными к его вершинам. В силу симметрии векторов, направленных в противоположные стороны, их можно рассматривать также и как диаметры додекаэдра. Направление каждого вектора выше было охарактеризовано двумя точками: точкой, из которой исходит радиус — центр додекаэдра (он является общим для всех 20 радиусов), и точкой, в которую направлен радиус, в данном случае одна из вершин додекаэдра. Положение этих вершин, в принципе, можно описать, используя какой-либо из стандартных методов для описания координат (прямоугольные, полярные и др.), однако для данного анализа это не имеет принципиального значения. Мы использовали для этого введенные ранее буквенные обозначения.

Внутри додекаэдра вектора образуют три группы, связанные взаимными преобразованиями симметрии (см. рис. 8.14, *б*). Обозначим преобразования симметрии относительно плоскости I (отражение) буквой α, относительно плоскости II (отражение) — буквой β и относительно плоскости III (вращение)– буквой γ. Тогда все преобразования векторов описываются табл. 8.1.

1-я и 2-я группы векторов локализованы в плоскости I и включают, соответственно, две пары взаимно перпендикулярных векторов, связанных тождественным преобразованием (1) вектора самого в себя ($\mathbf{A} \to \mathbf{A}$, $\mathbf{B} \to \mathbf{B}$) и преобразованием вращения γ вокруг оси C_2 относительно плоскости III: $A \to -A$ и $B \to -B$).

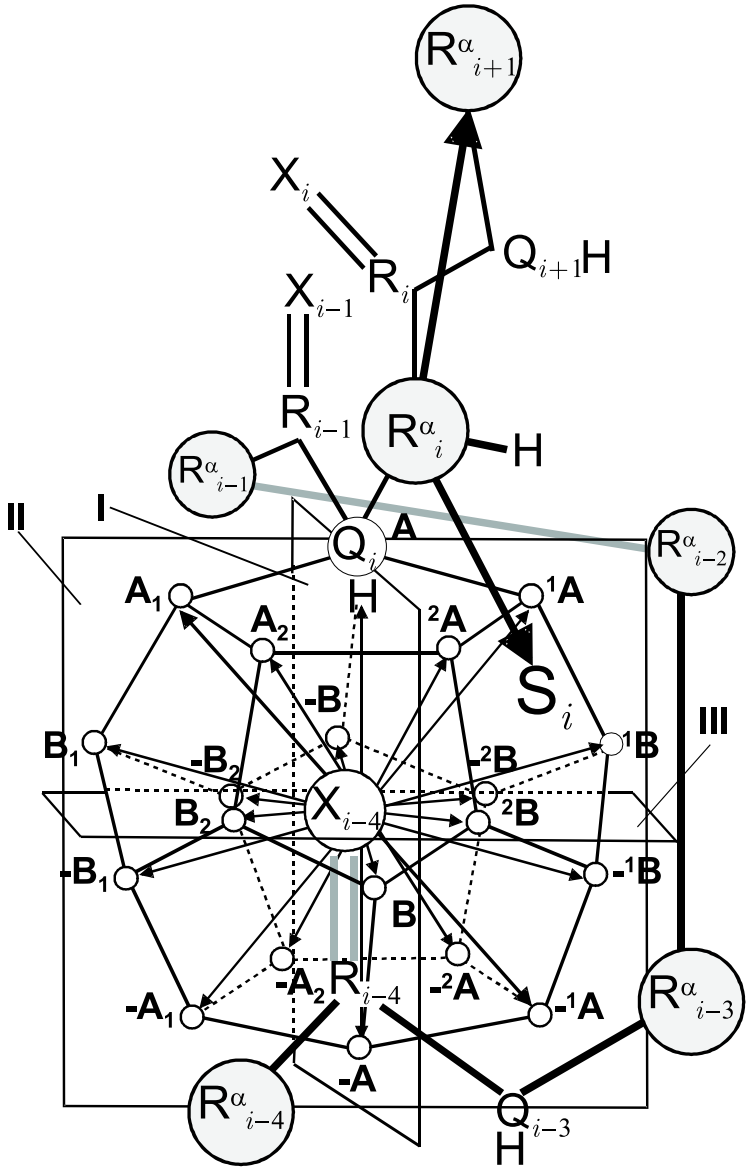


Рис. 8.15. Молекулярная векторная машина

3-я группа включает восемь векторов, обозначенных буквой **A** с индексами и связана тождественным преобразованием (1) вектора самого в себе ($\mathbf{A}_1 \rightarrow \mathbf{A}_1$), преобразованиями отражения α — относительно плоскости I ($\mathbf{A}_1 \rightarrow {}^1\mathbf{A}$) и β — относительно плоскости II ($\mathbf{A}_1 \rightarrow \mathbf{A}_2$), а также и их сочетанием — αβ ($\mathbf{A}_1 \rightarrow {}^2\mathbf{A}$). Эти элементы также связаны преобразованием вращения γ вокруг оси C_2 относительно плоскости III в разных сочетаниях (γ — $\mathbf{A}_1 \rightarrow -\mathbf{A}_1$, αγ — $\mathbf{A}_1 \rightarrow -{}^1\mathbf{A}$, βγ — $\mathbf{A}_1 \rightarrow -\mathbf{A}_2$, αβγ — $\mathbf{A}_1 \rightarrow -{}^2\mathbf{A}$).

Таблица 8.1

Группы векторов, связанные преобразованиями симметрии

	1	α	β	γ	αβ	αγ	βγ	αβγ
Группа 1	**A**			**–A**				
Группа 2	**B**			**–B**				
Группа 3	$\mathbf{A}_1$	$^1\mathbf{A}$	$\mathbf{A}_2$	$-\mathbf{A}_1$	$^2\mathbf{A}$	$-^1\mathbf{A}$	$-\mathbf{A}_2$	$-^2\mathbf{A}$
Группа 4	$\mathbf{B}_1$	$^1\mathbf{B}$	$\mathbf{B}_2$	$-\mathbf{B}_1$	$^2\mathbf{B}$	$-^1\mathbf{B}$	$-\mathbf{B}^2$	$-^2\mathbf{B}$

4-я группа включает восемь векторов, обозначенных буквой B с индексами и связанных теми же операциями преобразования симметрии, но сдвинутыми вниз по отношению к элементам группы 3. Так, имеется тождественное преобразование (1) ($\mathbf{B}_1 \to \mathbf{B}_1$), отражение α ($\mathbf{B}_1 \to {}^1\mathbf{B}$), отражение β — ($\mathbf{B}_1 \to \mathbf{B}_2$) и их сочетание — αβ ($\mathbf{B}_1 \to {}^2\mathbf{B}$), а также вращение γ относительно плоскости III в различных сочетаниях ($\gamma - \mathbf{B}_1 \to -\mathbf{B}_1$, $\alpha\gamma - \mathbf{B}_1 \to -{}^1\mathbf{B}$, $\beta\gamma - \mathbf{B}_1 \to -\mathbf{B}_2$, $\alpha\beta\gamma - \mathbf{B}_1 \to -{}^2\mathbf{B}$).

Все эти операции, проделанные для A_1 и B_1, могут быть проведены для любого из векторов этих двух групп.

8.5.2.2. ***Применение теоретико-группового подхода.*** Теоретико-групповой подход оказался очень эффективным в теоретической физике [22]. Мы применили его к анализу свойств векторов МВМ. Прежде чем проводить такой анализ, напомним основные аксиомы теории групп [22].

Определение группы. Непустое множество G с заданной на нем бинарной операцией: $G \cdot G \to G$ называется группой (G), если в нем выполнены следующие аксиомы:

1) *ассоциативность*: для любых a, b и c из G верно $(a \cdot b) \cdot c = a \cdot (b \cdot c)$;

2) *наличие нейтрального элемента*: в G существует элемент e такой, что для всех a из G справедливо $e \cdot a = a \cdot e = a$;

3) *наличие обратного элемента*: для любого a из G найдется элемент a^{-1} из G, называемый *обратным*, такой, что $a \cdot a^{-1} = a^{-1} \cdot a = e$.

Сопоставление этих аксиом с множеством векторов додекаэдра позволяет говорить о том, что это группа.

Ассоциативность векторов можно понимать так, что для любых векторов из этой группы результат их действия будет всегда один и тот же, если сохраняется последовательность их действия.

Наличие нейтрального элемента предполагает наличие такого вектора, появление и действие которого не меняет типа структуры.

Наконец, наличие обратного элемента предполагает наличие вектора, реализация которого коренным образом меняет характер структуры.

Рассмотрение векторов с позиции теоретико-группового подхода позволяет предполагать, что вектор A, действие которого всегда направлено на формирование циклического 4-х-звенного фрагмента, есть нейтральный элемент, а вектор –A, действие которого всегда направлено на разрушение 4-х-звенного фрагмента есть обратный элемент в этой группе.

8.5.3.1. ***Физические операторы как представления группы векторов.*** Из определения представлений группы [22] имеем следующее. Пусть имеется некоторая конечная группа G с элементами $g_1, g_2, \ldots, g_n$. Если группа T линейных операторов

Tg_i в некотором пространстве R гомоморфна группе G, то говорят, что группа T образует представление группы G. Из анализа свойств линейных операторов вытекает, что каждому элементу g_i группы можно сопоставить матрицу $\|D_{rk}(g_i)\|$. При этом нейтральному элементу должна быть сопоставлена нейтральная матрица, а обратному элементу — обратная матрица.

По аналогии с элементами группы и их представлениями, физические операторы можно назвать «неприводимыми представлениями» группы векторов. Определение «неприводимые» использованы нами в том смысле, что физические операторы являются самыми простыми и проще их не может быть. Используя эту аналогию, мы проведем сопоставление между группой векторов и группой физических операторов, воссоздающих действие этих векторов. Такое сопоставление оказывается полезным с точки зрения развития представлений о структурах, которые должен содержать канонический набор физических операторов.

8.5.3.2. ***Физические операторы, реализующие действие нейтрального и обратного элементов.*** Точкой приложения обоих множеств являются вершины додекаэдра. С одной стороны, это точки, в которые направлены вектора, действующие на связь $Q_iH\ldots X_{i-4}{=}R_{i-4}$, а с другой стороны, они являются местом приложения физических операторов, реализующих действие этих векторов.

Так вектор, который являющийся в группе векторов нейтральным элементом, должен воссоздаваться физическим оператором, который не должен влиять на структуру 4-х-звенного фрагмента. Это может означать, такой оператор может вообще не иметь боковой цепи, а является «пустым» звеном в цепи полимера. По своим свойствам он должен относится к подгруппе операторов связности.

Вектор, соответствующий обратному элементу группы, имеет противоположное по действию направление, направленное на разрыв связи $Q_iH\ldots X_{i-4}{=}R_{i-4}$. Его может реализовать такой физический оператор, у которого атом Q_i в принципе не может образовать водородную связь с группой $X_{i-4}{=}R_{i-4}$. Такая ситуация возможна, например, если атом Q_i заключен в циклическую структуру. Атом X_{i-4} может приобрести противоположное направление в результате «лобового» столкновения его электронной оболочки с электронной оболочкой этой циклической неполярной структуры. Такое столкновение может служить прототипом действия все физических операторов антисвязности.

8.5.3.3. ***Свойства физических операторов в структуре МВМ.*** Общие требования к физическим операторам были сформулированы ранее (раздел 8.4.2). В этом разделе мы рассмотрим свойства физических операторов, реализующих действие векторов структуре МВМ. Сделанные выводы будут использованы при построении модели структуры физических операторов, основой которой также как и МВМ, будет додекаэдр.

Длина оператора должна увеличиваться по мере изменения направления вектора в сторону атома X_{i-4}. Боковые цепи операторов, воссоздающих вектора, направленные в сторону атома Q_i, как это легко видеть из рис. 15, должны быть короче операторов, воссоздающих вектора, направленные в сторону X_{i-4}.

Вектора, направленные вправо от плоскости I, должны воссоздаваться более короткими операторами. Как видно на рис. 8.15, положение $R^{\alpha}{}_i$-атома, к которому прикрепляются физические операторы в МВМ, несколько асимметрично и сдвинуто вправо относительно связи $Q_iH\ldots X_{i-4}{=}R_{i-4}$. Это означает, что физические

операторы, воссоздающие вектора, направленные вправо от плоскости I, проходящей через $Q_iH...X_{i-4}=R_{i-4}$-связь, должны быть короче, чем операторы, реализующие действие векторов, направленных влево от этой плоскости. Данная закономерность должна появляться в отношении всех физических операторов, что должно приводить как формированию двух групп операторов с близкими свойствами, но разной длиной боковых цепей.

Вектора, ориентированные симметрично относительно плоскости II, должны воссоздаваться близкими по размеру операторами. Как видно на рис. 8.15, расстояние до вершин, в которые направлены вектора, находящиеся за плоскостью II, (направлены от нас), и перед плоскостью II (направлены к нам), различаются не очень сильно. По этой причине физические операторы, воссоздающие эти вектора, не должны существенно различаться в размере. Их различия могут состоять лишь в замене терминальных групп.

Вектора, расположенные над плоскостью III, должны воссоздаваться более короткими физическими операторами. Как видно на рис. 8.15, вершины векторов, направленных в сторону группы $HQ_i–R=X_{i-1}$, расположенные над плоскостью III, находятся значительно ближе в $R^{\alpha}{}_i$-атому, чем направленных в противоположную сторону (находятся под плоскостью III). По этой причине все вектора, находящиеся над плоскостью III, должны воссоздаваться более короткими физическими операторами, чем находящиеся под плоскостью III. При этом, поскольку эти вектора связаны операцией симметрии γ (вращение вокруг оси C_2), то операторы с самыми короткими боковыми цепями должны противостоять самым длинным. В то же время физические операторы, воссоздающие вектора, расположенные в экваториальной области додекаэдра должны отличаться в меньшей степени, например, на одно звено в цепи.

Следует также отметить, что физические операторы на МВМ образуют своеобразные семейства, обозначенный буквами A, –A, B и –B (как с индексами, так и без них). Они располагаются в МВМ на одном уровне и образуют своеобразные зоны. Эти семейства должны обладать рядом общих свойств. В частности, длина их боковых цепей должны быть примерно одного порядка.

Свойства операторов, воссоздающих вектора противоположного направления. Очевидно, что физические операторы, воссоздающие вектора противоположного направления, например, $A_1–(-^1A)$, $B_1–(-^1B)$ и т. д., должны обладать противоположными свойствами. Однако, нужно принять во внимание, что наклон оси этих векторов один и тот же, поскольку они направлены в противоположные вершины додекаэдра и вместе составляют его диаметр. По этой причине мы вправе ожидать, что направление $R^{\alpha}{}_i$ — R_i обоих физических операторов, воссоздающих вектора одинакового наклона, также должно быть одно и тоже.

8.5.3.4. ***Система физических операторов на додекаэдре.*** Высказанные в предыдущем разделе наблюдения мы обобщили виде формальной модели структуры канонического набора физических операторов на додекаэдре (рис. 16). Через структуру додекаэдра проведены три взаимно перпендикулярных плоскости (I, II, III). В отличие от плоскостей симметрии, проведенных через структуру додекаэдра при анализе векторов, на рис. 16 эти они являются плоскостями антисимметрии, так как боковые цепи операторов, расположенных относительно них, обладают сходными, но не идентичными свойствами.

Двадцать физических операторов (они обозначены теми же буквами, что и вершины МВМ) помещены в кружки в порядке увеличения размера сверху вниз. В плоскости I находятся 4 оператора А, В, –А, –В, являющиеся своеобразными начальными структурами, причем А приписываются свойства нейтрального элемента, а –А — обратного элемента. Все операторы с аналогичными индексами слева вверху и справа внизу расположены симметрично справа и слева относительно плоскости I. Операторы, расположенные справа от плоскости I (^{1}А, ^{2}А, $-^1$А, $-^2$А, ^{1}В, ^{2}В, $-^1$В, $-^2$В) должны быть короче, чем с индексами справа внизу ($А_1$, $А_2$, $-А_1$, $-А_2$, $В_1$, $В_2$, $-В_1$, $-В_2$). Операторы с близкими размерами, но разными (например, гомологичными) свойствами терминальных групп расположены симметрично сзади и спереди от плоскости II. На рис. 16 они образуют две группы над плоскостью III, причем одна, с индексом 1, находится за плоскостью II ($А_1$, $В_1$, ^{1}А, ^{1}В), $-А_1$, $-В_1$), а другая — с индексом 2 — перед плоскостью II ($А_2$, $В_2$, ^{2}А, ^{2}В). Аналогичные группы, но со знаком минус и с измененными индексами, расположены под плоскостью III: группа с индексом 2 находится за плоскостью II ($-^2$А, $-^2$В, $-А_2$, $-В_2$), а другая — с индексом 1 — перед плоскостью II ($-^1$А, $-^1$В, ($-А_1$, $-В_1$).

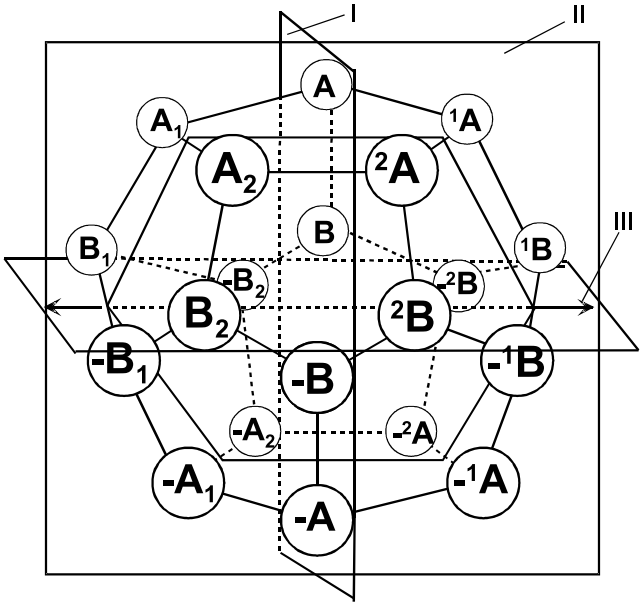


Рис. 8.16. Модель структуры канонического набора физических операторов на додекаэдре на основе принципов антисимметрии: I, II, III — плоскости антисимметрии; в кружках буквами обозначены боковые цепи физических операторов

Операторы с противоположными свойствами расположены поворотно симметрично относительно плоскости III. Наибольшими различиями должны будут обладать боковые цепи, расположенные в вершинах верхней и нижней грани додекаэдра: $А_1$–($-А_1$), $А_2$–($-А_2$), ^{1}А–($-^1$А), ^{2}А–($-^2$А). Различия боковых цепей, расположенных симметрично в экваториальной области додекаэдра $-В_1$–($-В_1$), $В_2$–($-В_2$), ^{1}В–($-^1$В), ^{2}В–($-^2$В), должны быть не столь существенны.

В целом, построенная нами система физических операторов на додекаэдре может служить прототипом для создания конкретных систем физических операторов. Именно на ее основе нами была предложена модель структуры канонического набора аминокислот (см. раздел 8.7.1.2).

8.5.3.5. ***Вырожденность свойств физических операторов. Двухъярусная модель молекулярной векторной машины.*** В начале раздела 8.5 мы упоминали, что количество конформаций, для которых нужны физические операторы, составляет порядка 62. Это очень много. В то же время, при анализе векторов (раздел 8.5.1) было выделено всего 20 направлений, для которых достаточно всего 20 физических операторов. Возникает вопрос: можно ли, при сохранении числа физических операторов, обеспечить воссоздание 62 конформаций?

Этот вопрос, по-видимому, решается достаточно просто. Рассмотрим физический оператор, воссоздающий одну из конформаций путем образования водородной связи между X_1 и X_{i-4} (рис. 8.17, *а*). Она описывается матрицей, в которой x_1, x_2, x_3

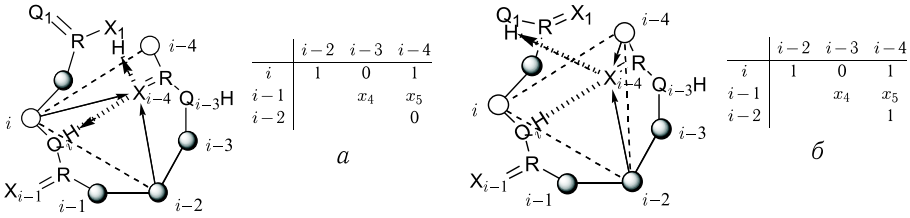


Рис. 8.17. Вырожденность состояний физических операторов: *а* — водородная связь между X_1–X_{i-4}; *б* — водородная связь между Q_1–X_{i-4}

принимают значения 1, 0 и 1, а x_6 — значение 0. Группа HX_1–R=Q_1, в которую входит X_1, является резонансной, вследствие чего положение двойной связи и атома водорода может быть иным — X_1=R–Q_1H. Как видно на рис. 8.17, *б*, перемещение атома водорода к Q_1 и образование водородной связи с X_{i-4} меняет направление вектора на Q_1 и, соответственно, распределение силовых линий. Появляется дополнительное ребро связности (x_6 равно 1). Нетрудно догадаться, что если x_5 будет равно нулю, то третья буква в триплетном топологическом коде, согласно выражению 8.4, будет K или L, а если $x_5 = 1$, то N или P. Таким образом, вследствие резонанса терминальной группы возникает пучок направлений, которые реализует один и тот же физический оператор. Очевидно, что в зависимости от типа этой терминальной группы количество векторов в пучке, т. е. степень вырожденности состояний этого оператора, будет варьировать — от единицы до 5 и более. При этом большинство операторов, содержащих на конце резонансные группы, будут, по видимому, иметь вырожденность равную двум.

Для того чтобы описать положение всех векторов, которые могут появиться вследствие вырожденности терминальных групп (расщепления исходных векторов), уже недостаточно модели додекаэдра. Однако обратим внимание, что общее направление физического оператора в вырожденных состояниях (рис. 8.17) остается неизменным. Вследствие этого многогранник, который подходил бы для этих целей, должен вписываться в структуру додекаэдра и составлять его нижележащий ярус. В качестве одного из таких нижележащих многогранников в двухъярусной модели МВМ может быть ромбоикосододекаэдр (рис. 8.18).

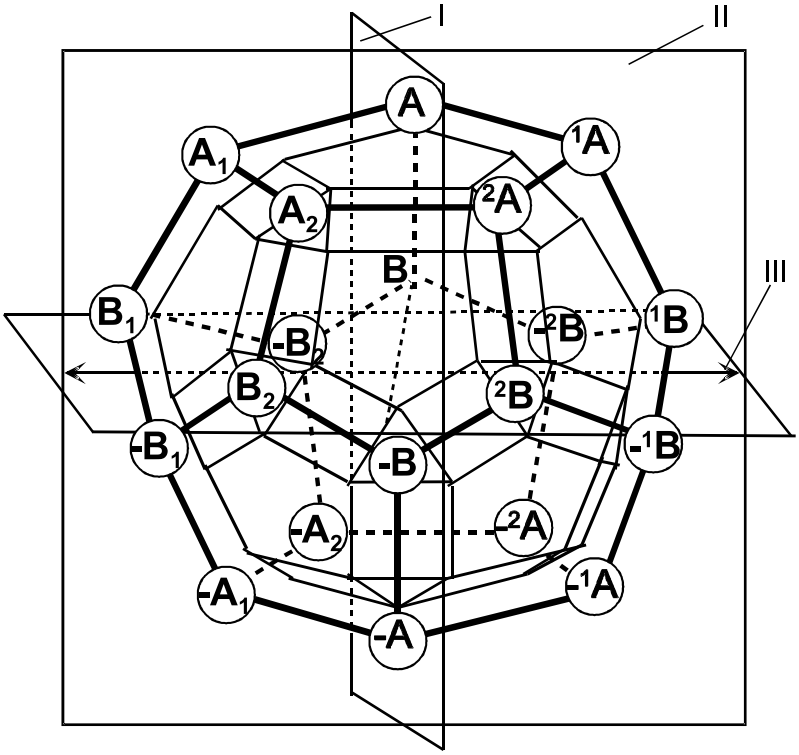


Рис. 8.18. Ромбоикосододекаэдр как возможный многогранник нижнего яруса молекулярной векторной машины

Напомним, что этот многогранник имеет 62 грани, 60 вершин и 120 ребер. Из общего числа 20 граней являются треугольными, 12 — пятиугольными и 30 — четырехугольными. Ромбоикосододекаэдр вписывается в додекаэдр таким образом, что его пятиугольные грани оказываются на гранях додекаэдра. Центры треугольных граней располагаются прямо под вершинами додекаэдра, что хорошо видно на рис. 18 для вершин додекаэдра ^{2}A, A_2, ^{2}B, B_2 и –B. Таким образом, центры граней ромбоикосододекаэдра, расположенные вблизи от вершин додекаэдра, вполне могут служить для описания положения групп векторов, реализуемых вырожденными состояниями терминальных групп физических операторов.

8.5.4.1. ***Анализ векторов.*** Согласно исходным условиям МВМ (см. начало раздела 8.5) атом $R^{\alpha}{}_i$, к которому прикрепляются боковые цепи канонического набора физических операторов, должен формировать тетраэдрическую структуру. Его четыре связи направлены в вершины тетраэдра и образованы (рис. 8.19 *а*) атомами Q_i, H_i, R_i,(группы X_i–R_i=Q_{i+1}H) и S_i (атом боковой цепи). При этом, как показано на рис. 19 *а* и б, резонансная группа X_{i-1}–R_{i-1}=Q_iH является плоской (см. раздел 8.5.1.1), представляет собой единое целое и может свободно вращаться. Через нее можно провести условную ось $R^{\alpha}{}_{i-1}$ — $R^{\alpha}{}_i$, на которой будет вращаться атом $R^{\alpha}{}_i$. Поскольку все связи тетраэдрического атома жесткие, то вектора, направленные на $i+1$-й атом основной цепи ($R^{\alpha}{}_{i+1}$) и на атом S_i боковой цепи будут жестко

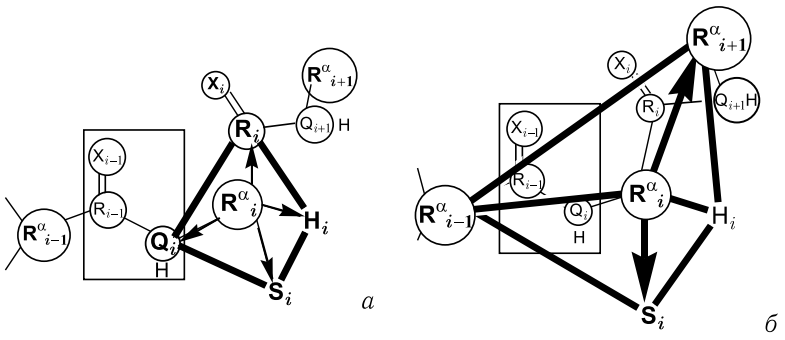


Рис. 8.19. Сопоставление тетраэдров, сформированных на основе $R^{\alpha}{}_i$: *а* — валентными связями $R^{\alpha}{}_i$, направленными в вершины тетраэдра; *б* — векторами, направленными на $R^{\alpha}{}_{i+1}$ основной цепи и $S^{\alpha}{}_i$ боковой цепи

фиксированы и взаимосвязаны между собой (рис. 19 *б*). Это означает, что всякое перемещение боковой цепи в процессе воссоздания закодированной конформации полимера будет синхронно отражаться на векторе $R^{\alpha}{}_i$–$R^{\alpha}{}_{i+1}$. Таким образом, боковые цепи полимера, связанные с тетраэдрическим α-атомом, в рамках модели МВМ, предопределяют направление роста основной цепи.

8.5.4.2. ***Возможные связи группы X_i=R_i–$Q_{i+1}H$ с основной цепью.*** В зависимости от возможной связи группы X_i=R_i–$Q_{i+1}H$ с основной цепью можно выделить четыре варианта направлений, три из которых показаны на рис. 8.20. В том случае, если физический оператор S задает направление, при котором возможна водородная

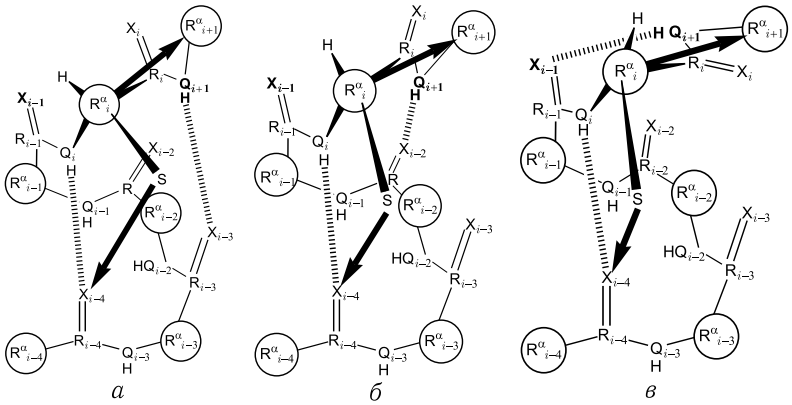


Рис. 8.20. Варианты возможной водородной связи группы X_i=R_i–$Q_{i+1}H$: с атомом X_{i-3} (*а*), с атомом X_{i-2} (*б*); с атомом X_{i-1} (*в*)

связь $Q_{i+1}H$ с атомом X_{i-3} (рис. 20, *а*), то спиральная конформация цепи остается неизменной (напомним, что предыдущая водородная связь была $Q_iH\ldots X_{i-4}$). Это направление на Q-матрице (см. разделы 8.3.1 и 8.3.2) можно записать как 001. Однако, в зависимости от того, будет ли в $i+1$-м положении оператор связности или оператор анти-связности, эта связь образуется или не образуется. Логика сложения переменных будет такой: $001 + x_1x_21 \rightarrow x_1x_21$ для операторов связности

и $001 + x_1x_20 \to x_1x_20$ для операторов антисвязности. При этом МВМ, как и на исходном этапе, будет целиком встраиваться в эту структуру.

В случае, когда физический оператор задает направление, допускающее образование водородной связи группы группы X_i=R_i–Q_{i+1}H с атомом X_{i-2} (рис. 20 *б*), то спиральная структура становится более крутой (аналог спирали 3_{10} в белках). На Q-матрице это направление можно описать триадой 010. Вследствие большей крутизны этой можно ожидать, что операторы антисвязности приобретают такую конформацию, при которой они не будут работать (направлены выше связи $Q_{i+1}H\ldots X_{i-2}$). Что касается операторов связности, то они не реализуют части своих возможностей, поскольку будет отсутствовать связность третьего элемента триады ($Q_{i+1}H\ldots X_{i-3}$). Это означает, что в триаде 010, детерминированной i-и операторами, переменная x_2 не меняет своего значения при установке векторной машины в $i+1$-е положение. Логику сложения будет такой: $010 + x_1x_21 \to x_110$ для операторов связности и $010 + x_1x_20 \to 010$ для операторов антисвязности.

Следует отметить, что направление оси МВМ, установленной в $i+1$ положении, идущее вдоль связи $Q_{i+1}H\ldots X_{i-3}$, параллельно оси МВМ, идущей вдоль связи $Q_1H\ldots X_{i-4}$. В то же время, ось структуры МВМ вдоль связи $Q_{i+1}H\ldots X_{i-2}$ при установке ее в $i+1$-е положение не является параллельной оси связи $Q_1H\ldots X_{i-4}$. Нижняя ее часть смещается влево, а верхняя — вправо. Как следствие этого, левая нижняя часть вершин додекаэдра не вписывается в структуру этой спирали. Это означает, что структура МВМ для этой спирали частично редуцирована, и некоторые физические операторы в этой области встречаться не будут.

Третий вариант связи, который может быть задан физическими операторами из i-го положения, образован группой X_i=R_i–Q_{i+1}H с атомом X_{i-1} (рис. 8.20 *в*). Это направление на Q-матрице можно описать триадой 100. Крутизна этой связи такова, что на нее не могут действовать ни операторы связности, ни операторы антисвязности. Логика сложения с этой триадой будет такой: $100 + x_1x_21 \to 100$ для операторов связности и $100 + x_1x_20 \to 100$ для операторов антисвязности. Ось МВМ вдоль связи $Q_{i+1}H\ldots X_{i-1}$, еще более отклонена от параллельности с осью связи $Q_1H\ldots X_{i-4}$. МВМ, установленная в i+1-ю вершину, в этом случае еще более редуцируется. Таким образом, вполне вероятно, что для реализации этого направления допустимо использование лишь нескольких, а возможно и одного элемента векторной машины.

Четвертым вариантом будет неопределенное направление, при котором связь водородная связь группы X_i=R_i–Q_{i+1}H с каким-либо элементом цепи отсутствует. Это направление, очевидно, также может задавать часть операторов, связанных с атомом $R^{\alpha}{}_i$. Матричное описание его будет 000. Возникающая структура обладает максимальной подвижностью, что бывает необходимо в тех случаях, когда должны воссоединиться блоки с образованной вторичной структурой.

В заключение раздела отметим, что предложенные матричные описания структур, которые задаются направлением $i+1$-й связи, и логика сложения переменных, должны быть, по-видимому, учтены при разработке нового алгоритма кодирования-декодирования кодирования n-звенного цепного полимера (раздел 8.3), который будет адекватно описывать декодированную структуру.

8.5.4.3. ***Группировка физических операторов в связи с заданием направлений связи $R^{\alpha}{}_i$–R_i α-атома.*** Мы рассмотрели четыре варианта направлений и три варианта связей, которые могут возникать в процессе работы МВМ. Эти направления

задаются поворотом связи R^{α}_i — R_i α-атома в процессе работы физических операторов. Очевидно, что ограниченность числа направлений должна приводить к тому, что в соответствии со способностью определять то или иное направление на R^{α}_{i+1} атом физические операторы должны образовать четыре группы. Чисто теоретическое решение этого вопроса, на наш взгляд, невозможно, поскольку необходимо анализировать свойства каждого конкретного оператора. Однако некоторые аспекты этой проблемы все же можно обсудить.

Как видно на рис. 8.20, чем дальше направление вектора физического оператора от центра, тем выше ориентирован вектор связи R^{α}_i–R_i, что хорошо заметно при сравнении рисунков 8.20, *а* и 8.20, *б*. Это означает, что наиболее подходящими для задания направления связи $Q_{i+1}H\ldots X_{i-3}$ являются операторы, воссоздающие вектора, расположенные слева в экваториальной области МВМ, т. е. B^1 и $-B^1$. Если учесть, что операторы-антиподы (например, B_1–$(-B^1)$ и B^1–$(-B_1)$), по-видимому, должны задавать одинаковое направление (см. раздел 8.5.3.3), то вот уже и определилась одна из возможных подгрупп, задающих спиральную структуру основной цепи. Она расположена в экваториальной области додекаэдра и принцип ее формирования — симметричные преобразования векторов МВМ.

Группой физических операторов, задающих более крутую спираль (связь $Q_{i+1}H\ldots$ $\ldots X_{i-2}$), могут быть операторы, приближенные вертикальной плоскости I, проходящей через центр МВМ (см. рис. 8.20 *б*). В эту группу входят все операторы, воссоздающие вектора, связанные преобразованиями симметрии т. е. ^2A–$(-A_2)$ и ^2B–$(-B_2)$.

Аналогичным образом можно рассмотреть и другие группы операторов, однако, как мы сказали, более целесообразно такое рассмотрение проводить на экспериментальной основе.

8.5.5. Модель МВМ как основа систематизации функциональных групп физических операторов. Резонансная группа HQ_{i-3}–R_{i-3}=X_{i-4}, из атома X_{i-4} которой исходят все вектора МВМ, может входить в структуре цепного полимера в состав ССИВС. Вследствие этого структура МВМ может служить не только основой для построения системы физических операторов, но и использоваться для разработки системы терминальных групп, реализующих действие векторов. При этом вектора, можно рассматривать не только как направления действия боковой цепи при ко-трансляционном сворачивании полимера, но и как «сигналы», направленные из ССИВС полимера на входы этих групп. Последние будут выступать в качестве логических модулей ССИВС. Мы уже рассматривали с этих позиций боковые цепи аминокислот (раздел 6.2.2). Проведение такого анализа с использованием МВМ, в которой заложены отношения симметрии векторов и антисимметрии боковых цепей, позволяет провести такой анализ более углубленно. В этом разделе мы сформулируем общие идеи относительно порядка расположения таких модулей

8.5.5.1. ***Вырожденность состояний терминальных групп и их функции.*** Для того чтобы уяснить, как связаны вырождение и функции терминальных групп, снова рассмотрим рис. 8.17. Сигнал от X_{i-4} группы HQ_{i-3}–R_{i-3}=X_{i-4} может направиться только к атому X_1 группы HX_1–R=Q_1 (на рис. 17 *а*), связанному с атомом водорода, который на данный момент служит входом (см. раздел 6.1.1). Данная группа имеет, таким образом, 1 вход и несколько выходов (см. аналогию с группой HO–C=O, раздел 6.2.2). В том случае, если атом водорода будет находиться у атома Q_1 группы X_1=R–Q_1H (рис. 8.17 *б*), то и в этом случае терминальная группа будет иметь 1

вход и несколько выходов. В случае, если атом X_1 группы $H_2X_1–R=Q_1$ связан с двумя атомами водорода, каждый из которых может использоваться для воссоздания направлений векторов, то функция у этой группы также будет одна — клапан с двумя входами и несколькими выходами (см. аналогию с группой $H_2N–C=O$, раздел 6.2.2). Точно так же могут быть рассмотрены и другие варианты вырожденности состояний в группах. Таким образом, вырожденность не влияет на логическую функцию группы и их количество будет много меньше, чем число вырожденных состояний.

8.5.5.2. ***Терминальные модули как неприводимые представления группы векторов.*** Как и ранее (раздел 8.5.3.2), это означает, что в ней должны быть нейтральный и обратный элементы. Нейтральный элемент не должен влиять на процесс переноса заряда, тогда как обратный элемент может быть основой для инициации цепи.

Физические операторы формируют своеобразные семейства (см. раздел 8.5.3.2), обозначенные на рис. 8.16 буквами A, –A, B и –B, которые связаны со взаимодействием с определенной частью додекаэдра. Эти семейства должны обладать близкими структурными свойствами (например, близкой длиной цепи). Вероятно, и логические функции терминальных групп этих семейств также должны быть близки. На это указывает также симметрия векторов, расположенных симметрично по отношению к плоскости I и к плоскости II, а также отношения анти-симметрии реализующих их физических операторов (рис. 8.16). Функциональные группы семейств, расположенных симметрично по разные стороны от плоскости III, должны обладать противоположными функциями, так как они воссоздают вектора, направленные в противоположных направлениях.

8.5.5.3. ***Количество основных функций.*** Как мы показали, в структуре МВМ, можно выделить по крайней мере 20 основных векторов, из которых две пары векторов находятся в плоскости 1, а две группы по 4 пары связаны преобразованиями симметрии (раздел 8.5.2.1). Поскольку терминальные группы выступают в качестве неприводимых представлений, то их функции также могут быть заданы этими преобразованиями. Это означает, что для построения системы модулей можно исходно задать лишь 4 основных функции (в плоскости 1 две, и для каждого октета — по одной), остальные же функции будут получаться путем их симметричного преобразования. Все эти соображения будут реализованы в применении к боковым цепям аминокислот в разделе 8.7.4.

8.6. Модель топологического кодирования и биоструктуры

В настоящем разделе будет проведено сопоставление результатов, полученных на основе развитой нами модели топологического кодирования цепных полимеров и теми данными, которые имеются на сегодняшний день для биоструктур (генетического кода и белков), рассматриваемых, как и ранее, в качестве частных случаев бионических структур. В качестве дополнительного введения будут рассмотрены современное состояние исследований структуры генетического кода и, несколько позже, структуры канонического набора аминокислот.

8.6.1.1. ***Современная таблица генетического кода.*** Проблема поиска идеальной формы для генетического кода не нова. Первые попытки в этом направлении, проведенные вскоре после экспериментальной расшифровки соответствий триплет-

аминокислота приведены в монографии [23]. В работе [24] была предложена таблица, форма которой ныне является общепринятой (рис. 8.21). В ней буквы триплетов выписаны для обозначения строк (первая буква), столбцов (вторая буква) и строк внутри горизонтальных клеток (третьи буквы), а соответствующие им аминокислоты находятся в клетках. При этом буквы в таблице расположены в последовательности U, C, A, G.

1 \ 2	U	C	A	G	3
U	Phe	Ser	Tyr	Cys	U
	Phe	Ser	Tyr	Cys	C
	Leu	Ser	STP	STP	A
	Leu	Ser	STP	Trp	G
C	Leu	Pro	His	Arg	U
	Leu	Pro	His	Arg	C
	Leu	Pro	Gln	Arg	A
	Leu	Pro	Gln	Arg	G
A	Ile	Thr	Asn	Ser	U
	Ile	Thr	Asn	Ser	C
	Ile	Thr	Lys	Arg	A
	Met	Thr	Lys	Arg	G
G	Val	Ala	Asp	Gly	U
	Val	Ala	Asp	Gly	C
	Val	Ala	Glu	Gly	A
	Val	Ala	Glu	Gly	G

Рис. 8.21. Общепринятая форма представления генетического кода (по [20])

Такая последовательность букв, как считает автор, наиболее полно выявляет особенности генетического кода [24]. Было отмечено, что столбцам, кодируемым триплетами с буквами U, C (вторая буква триплета) соответствуют главным образом гидрофобные (Phe, Leu, Ile, Val, Ala, Pro) и слабо полярные (Ser, Thr) аминокислоты, в то время как тем, которые содержат A, G — сильно полярные аминокислоты (Asp, Glu, Asn, Gln, His, Arg, Lys). Третье основание несущественно влияет на значение кодируемого остатка (вырожденность третьего основания триплетов). Замена основания в первом положении не изменяет существенно характер аминокислоты (позднее это свойство было названо связностью аминокислотных серий [25]. Было также найдено, что замена в одном основании триплета часто кореллирует с минимальными изменениями в боковой цепи аминокислот. Автор предполагает, что такая корреляция не является случайной.

Таблица с иной последовательностью букв — A, C, G, U была предложена в работе [26]. По мнению автора, такая последовательность лучше выявляет принципы генетического кода. Существуют также иные формы представления кода: в виде круга [25], кольца [27] и калиграммы [28], однако эти формы практически ничего не добавляют к раскрытию структуры кода.

8.6.1.2. ***Принципы построения дуплетного кода.*** Возможность исследования структуры дуплетного генетического кода основаны на вырожденности третьего основания в триплетах. Согласно работам [29, 30] в каждом триплете можно выделить двухбукванный корень (дуплет) и однобуквенное окончание, флексию. Шестнадцать дуплетов автор подразделил на два октета [29, 30]. Восемь дуплетов кодирует по одной аминокислоте (GG, GU, AC, CU, UC, CG, GC, CC) и восемь дуплетов — по два значения (UU, UG, CA, AG, GA, AU, UA, AA). Взаимный переход этих двух

множеств подчинялся правилу: C ↔ A, G ↔ U (правило Румера [29, 30]), например: GG ↔ UU, CG ↔ AU, CC ↔ AA. Схема 8.13 представляет матрицу дуплетов, предложенную в работе [30] на основе канонической последовательности оснований C, G, U, A:

CC	CG	CU | CA
GC	GG	GU | GA
UC	UG	UU UA
AC	AG	AU AA

. (8.12)

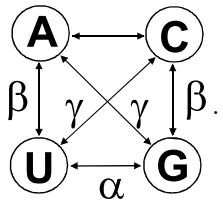
Эта матрица может быть переписана в ромбической форме (схема 8.14)

CC	
GC CG	Сильные
UC GG CU	
AC UG GU CA	Переходные
AG UU GA	
AU UA	Слабые
AA	

. (8.13)

В верхней части ромба находятся дуплеты, кодирующие по одной аминокислоте (сильные), в нижней части — дуплеты, кодирующие по две аминокислоты (слабые). На диагонали находятся переходные дуплеты. При другой последовательности букв, отличающейся от канонической, сильные и слабые дуплеты перемешиваются между собой.

Результаты, полученные в работах [29, 30] в свое время не были замечены и были заново открыты через 6–7 лет. Так, в работе [31] было предложено два субкаталога для дуплетов монокодонов, кодирующих по одной аминокислоте и гетерокодонов, кодирующих по две аминокислоты. Детальный анализ симметрии дуплетов в генетическом коде был проведен в работе [32]. Авторы выделили два множества дуплетов — M_1 и M_2. Дуплеты множества M_1 принадлежат к четырежды вырожденным триплетам, а множества M_2 — к дважды вырожденным триплетам. Буквы в дуплетах расположены по вертикали в последовательности C, U, G, A, а по горизонтали — в порядке C, A, G, U. Чтобы исследовать структуру множеств M_1 и M_2 авторы ввели операторы обмена дублетов (doublet-exchange operators) (σ_i, σ_j), которые преобразуют четыре основания A, C, U, G в парах, как показано на схеме 8.15:



. (8.14)

Биохимически, согласно авторам, операторы σ_i имеют следующее значения: $\sigma_1 = 1$ = идентичность, $\sigma_2 = \alpha$ =трансверсия межу некомплементарными основаниями; $\sigma_3 = \beta$ = трансверсия между комплементарными основаниями, $\sigma_4 = \gamma$ = транзиция пурин ↔ другой пурин, пиримидин ↔ другой пиримидин. Математически, σ_i образует Абелеву группу (группу Клейна-4) (схема 8.16):

$$1^2 = \alpha^2 = \beta^2 = \gamma^2 = 1. \tag{8.15}$$

Оператор σ_i действует на первое основание дуплета, а σ_j — на второе основание. С помощью операторов (α, α) и (γ, α) два октета дуплетов были трансформированы один в другой.

В работах [33, 34] был предложен ромбический вариант генетического словаря, основанный на комплементарности кодирующих дуплетов, который наглядно представил найденные в [29, 30] закономерности (рис. 8.22). В качестве основы для построения данной структуры были использованы две пары дуплетов, совпадающие с каноническим порядком оснований [22] и подчиняющиеся правилам комплементарности Уотсона — Крика (C ↔ G, U ↔ A). Они расположены на вертикальной диагонали ромба. Остальные дуплеты были получены комбинацией исходных пар. В таблице дуплеты находятся вместе с кодируемыми аминокислотами, что позволяет проводить их совместный анализ. Как видно из рис. 8.22, имеется две группы дуплетов, кодирующих по одной и по две аминокислоты (разделены сплошной линией). Они преобразуются друг в друга согласно правилу Румера (C ↔ A, G ↔ U) и связаны симметрией C_2: AC ↔ CA, UC ↔ GA, GC ↔ UA и т. д. Традиционный вариант таблицы кода с каноническим порядком оснований был предложен в работе [35].

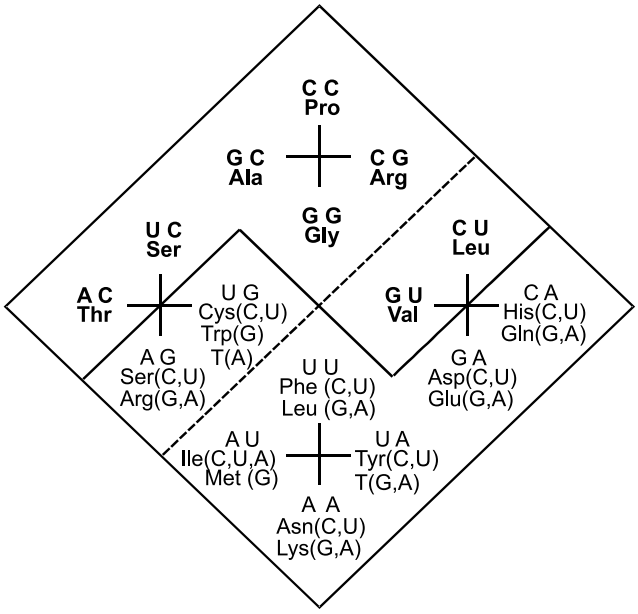


Рис. 8.22. Ромбический вариант генетического словаря на основе комплементарности кодирующих дуплетов (по [33, 34])

Дальнейший этап в исследовании структуры генетического кода связан с пространственной интерпретацией дуплетного кода. Для характеристики взаимоотношений между дуплетами в работе [36] были использованы группа Клейна-4 и операторы обмена между основаниями. Вместо табличной формы, описанной в работе [32], авторы предложили использовать граф группы — четырехмерный гиперкуб (тессеракт), который наглядно представил трансверсии между некомплементарными основаниями (α) и комплементарными основаниями (β) (рис. 8.16).

При этом дуплеты, кодирующие по одной аминокислоте, занимают в гиперкубе компактное положение. Авторы этой работы пришли к выводу о важности взаимоотношений между алгебраической структурой кода и его биологической структурой. Позднее, в работе [37] была предложена иная версия структуры дуплетного кода. В отличие от работы [36], рассматривающей в качестве основных переходов α, β трансверсии, авторы вводят β, γ переходы, поскольку α-оператор производит 2-х-битовые изменения, в то время как β, γ-операторы осуществляют только однобитовые

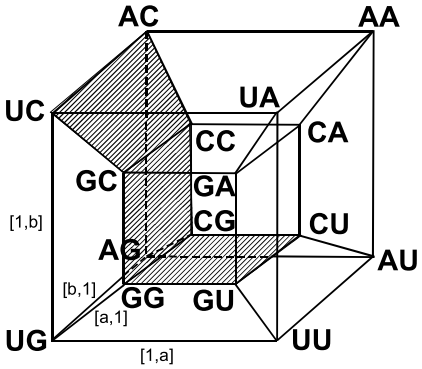
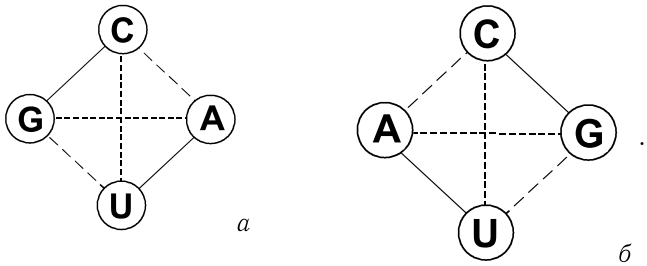


Рис. 8.23. Пространственный граф дуплетного генетического кода (по [36]): α — переход между некомплементарными основаниями (C ↔ A, G ↔ U); β — переход между комплементарными основаниями (C ↔ G, U ↔ A)

изменения (см. ниже). Следует отметить, однако, что оба варианта имеют дело только с дуплетами оснований, но не касаются свойств кодируемых ими аминокислот.

Несколько иной подход к построению пространственной структуры дуплетного кода был предложен в работе [34]. В соответствии с топологическим понятием «окрестности точки» [38], положение данной точки среди множества других точек определяется положением ее ближайших соседей. Если множество состоит из четырех точек (азотистых оснований), то каждая из них определяется через отношение с тремя другими. Авторы представили это положение в виде трехмерного графа, тетраэдра, а азотистыми основаниями в его вершинах. Этот граф можно представить в виде двух диастереомеров — L and D. В первом графе каноническая последовательность C, G, U, A записана против часовой стрелке, а во втором — и по часовой стрелке (схема 8.17, а, б):

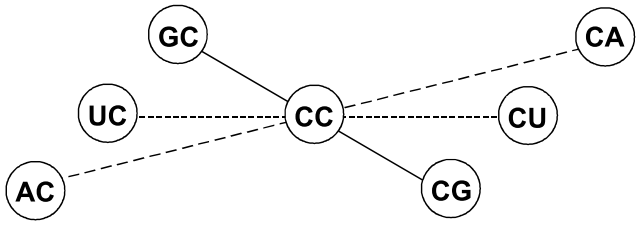


. (8.16)

Как показано на схеме 8.17, азотистые основания могут претерпевать следующие преобразования: C ↔ G, U ↔ A — переходы между взаимно комплементарными

пуринами и пиримидинами (сплошные линии); C ↔ U, G ↔ A — переходы между взаимно гомологичными основаниями (частый пунктир); и C ↔ A, G ↔ U — переходы между некомплементарными основаниями (редкий пунктир). Они соответствуют операциям β, γ, и α, введенным в работе [32].

Структуру генетического кода можно также построить в виде двух вариантов (диастереомеров). Авторы работы [34] предложили далее структуры, основанные на одном из стереомеров (схема 8.17, а). При этом была использована последовательность оснований C, G, U, A, которая сохраняет симметрию C_2 между подмножествами M_1 и M_2, а также минимум структурных изменений в структуре аминокислот в случае переходов между ближайшими дуплетами в ромбическом варианте генетического словаря. В соответствии с понятием окрестности точки, каждый дуплет может быть связан единичным переходом с шестью ближайшими дуплетами: по три связи как для первого, так и для второго основания (схема 8.18):



. (8.17)

В результате последовательного построения авторы работы [34] получили структуру (рис. 8.34), изоморфную булеву гиперкубу B^4 [14]. Она является шестимерным симплексом, поскольку помимо основных переходов, характерных для гиперкуба B^4, в ней наложены переходы между вершинами, расположенными по диагонали параллелограммов, образующих циклы.

Как следует из рисунка, эта структура состоит из двух групп дуплетов: восемь дуплетов кодирует по одной аминокислоте (на рисунке кружки показаны утолщенными линиями, а буквы выделены жирным шрифтом), а восемь дуплетов кодирует по две аминокислоты. Основания, связанные преобразованием Румера (C ↔ A, G ↔ U), занимают на плоском изображении гиперкуба симметричное положения (группа симметрии C_2), например: CC ↔ AA, GC ↔ UA, AC ↔ CA, и т. д. Как и в других вариантах четырехмерного представления дуплетного кода [36, 37], на этом варианте структуры показаны элементы, связанные единичными переходами, отличающимися на один бит информации — сплошные линии (β) и частый пунктир (γ). В дополнение к этому, на рис. 8.34 показан и третий тип переходов — редкий пунктир (α). Таким образом, в отличие от предыдущих структур [36, 37], на данной структуре наглядно представлены все три типа возможных переходов азотистых оснований. В данной структуре наглядно видно, что квартеты дуплетов объединяют структурно близкие аминокислоты. Так, большая часть аминокислот, кодируемая дуплетами AC, UC, UG и AG содержат C–OH и C–SH группы; дуплеты GG, CG, UG и AG включают все известные кодоны, кодирующие аргинин; дуплеты GU, CU, UU и AU кодируют неполярные аминокислоты; а дуплеты AA, GA, CA и UA — только полярные. Предложенная структура показывает, что эти квартеты дуплетов формируют замкнутые циклы.

8.6.1.3. ***Пространственная структура триплетного генетического кода.*** Первые попытки предложить пространственную интерпретацию триплетного кода в виде икосаэдра [39] и тетраэдра [40] оказались неудачными, поскольку в них от-

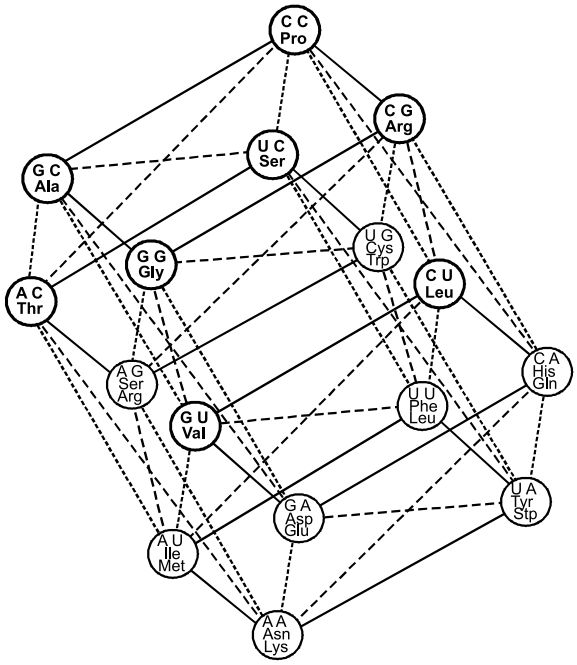


Рис. 8.24. Пространственная структура дуплетного генетического кода, изоморфная булеву гиперкубу B^4 [по 34]. Сплошные линии — переходы C ↔ G, U ↔ A (β); частый пунктир — переходы C ↔ U, G ↔ A (γ); редкий пунктир — C ↔ A, G ↔ U (α)

сутствовала однозначная связь между элементами кода и элементами предложенной геометрической структуры. Прогресс в исследовании пространственной структуры триплетного кода был достигнут лишь в последнее десятилетие двадцатого века [34, 37, 41, 42].

Согласно работе [42], существующая таблица генетического кода (рис. 8.25) позволяет легко и быстро находить аминокислоты, соответствующие тому или иному триплету, однако она не дает пространственного представления о триплетах и их взаимосвязях, поскольку она является плоской, а триплеты заданы в ней в неявном виде. Чтобы этого достичь, в работе [42] была предложена идея «последовательных пространств». Для этого пуриновые основания (A или G) были обозначены буквой R, а пиримидиновые (C, U или T) — буквой Y. В результате вместо 64 триплетов была получена группа из 8 триплетов, в которой вместо четырех азотистых оснований фигурируют буквы R и Y: RRR, RRY, RYR, YRR, RYY, YRY, YYR, YYY. Эти триплеты были расположены в вершинах большого куба (рис. 8.25) — выделены жирным шрифтом (первое трехмерное пространство).

Если теперь придать каждому триплету свое реальное значение, например, для RRR: GGG, GGA, GAG, AGG, GAA, AGA, AAG, AAA, то для каждой вершины возникает еще одно трехмерное пространство. Таким образом, общее количество

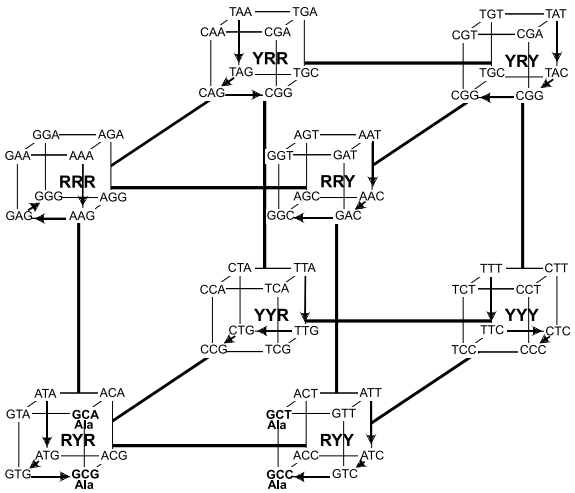
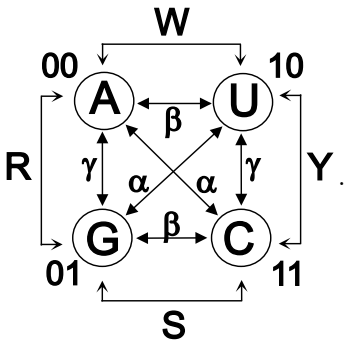


Рис. 8.25. Пространственная структура триплетного генетического кода (по [42])

измерений в этом гиперкубе — шесть: 3 измерения в большом кубе и 3 — в малых кубах. В результате, все 64 триплета расположились в 8 малых кубах.

Иной подход к пространственному представлению триплетного кода был предложен в работах [37, 41]. Согласно этому подходу, может быть предложена бинарная интерпретация генетического кода как кода Грея. В соответствии с интерпретацией авторов, с генетическим кодом может быть связано большое число различных кодов Грея, в зависимости от порядка выделения одного бита в кодовом слове. Для обоснования своего выбора авторы анализировали значение химического типа азотистых оснований, обозначив буквой R — A, G — пурины, а буквой Y — C, U — пиримидины и характер водородных связей: — W (слабый (weak) — A,U), две водородных связи, и S (сильный (strong) — G,C), три водородных связи в парах Уотсона–Крика (схема 8.19). Они приняли, что первый бит в бинарном кодировании — это тип химической связи (R — 0, Y — 1), а второй бит — характер водородной связи (W — 0, S — 1), и приписали следующие соответствия: A = 00, G = 01, U = 10, C = 11. Следует отметить, что ранее предлагались и другие варианты



(8.18)

соответствий букв триплетов и бинарных пар [27, 36, 43].

Пространственным представлением кода из шести переменных является булев гиперкуб B^6. Используя выбранные соответствия, авторы [37, 41] трансформировали гиперкуб в триплетный генетический код. Вершины гиперкуба были обозначены соответствующими кодонами (рис. 8.26 *а*). Расположение аминокислот, с использованием однобуквенных обозначений, было показано авторами на другой структуре. При этом мы заменили однобуквенные обозначения, примененные в работе [37], на трехбуквенные обозначения (рис. 8.26 *б*).

Авторы подчеркивают принципиальную важность единичных изменений азотистых оснований на гиперкубе, поскольку они учитывают двойственный характер каждого основания. Следует отметить, что на этой структуре, в отличие от предыдущей [42], довольно четко просматривается возможность перехода триплетов из одной группы в другую по правилу Румера. Одна часть триплетов, до преобразования, показана обычным шрифтом (рис. 8.26 *а*), а другая часть, после преобразования — выделена жирным шрифтом.

Принципиальная новизна третьего варианта генетического кода в форме гиперкуба B^6 состоит в том, что она построена исходя из понятия окрестности точки, примененном ранее (раздел 8.5.1.2), к дуплетному генетическому коду [10, 34]. В процессе построения авторы пришли к форме гиперкуба, описанной в работе [14]. Эта версия структуры генетического кода (рис. 8.27, цветная вклейка, и 8.28) существенно сложнее двух предыдущих (рис. 8.25, 8.26). В 64 вершинах гиперкуба авторы расположили как триплеты, так и кодируемые ими аминокислоты. Связь между триплетами была задана единичными переходами оснований, благодаря которым ближайшие соседние триплеты отличаются друг от друга на одно основание. На рис. 8.27 показаны единичные переходы оснований типа β и γ, а на рис. 8.28, (в связи с технической трудностью четко показать все переходы на одном рисунке) — переходы типа α. В них сохраняются основные свойства булева гиперкуба, рассмотренные в разделе 8.2.1.5. — ярусность и иерахичность.

Триплеты образуют семь ярусов, из которых два содержат по одному триплету, два — по шесть, два — по пятнадцать и один, центральный слой — двадцать триплетов. Структура кода является иерархической и распадается на два множества M_1 и M_2 по 32 триплета, четыре подмножества SM_1–SM_4 по 16 триплетов и 8 октетов (O_1–O_8).

Будучи основана при построении на канонической последовательности азотистых оснований, она выявляет разделение аминокислот на две группы. Восемь квартетов триплетов в верхней части структуры (кружки выделены жирными линиями и а триплеты — жирным шрифтом) кодируют по одной аминокислоте и восемь квартетов — по два значения. Каждый триплет верхней группы связан с триплетом нижней группы симметрией C_2 и преобразованием Румера ($C \leftrightarrow A$, $G \leftrightarrow U$).

Таким образом, в настоящее время имеется три варианта структуры генетического кода, изоморфные булеву гиперкубу B^6 [34, 37, 42], построенные исходя из разных посылок. Это свидетельствует, очевидно, о том, что именно данная структура, скорее всего, должна соответствовать реальной пространственной структуре триплетного генетического кода.

8.6.2. Трансформация суперматрицы в триплетный генетический код. В разделе 8.2.2 было показано, как, с использованием четырех букв латинского алфавита — K, L, N и P, можно трансформировать суперматрицу, содержащую 64 матрицы

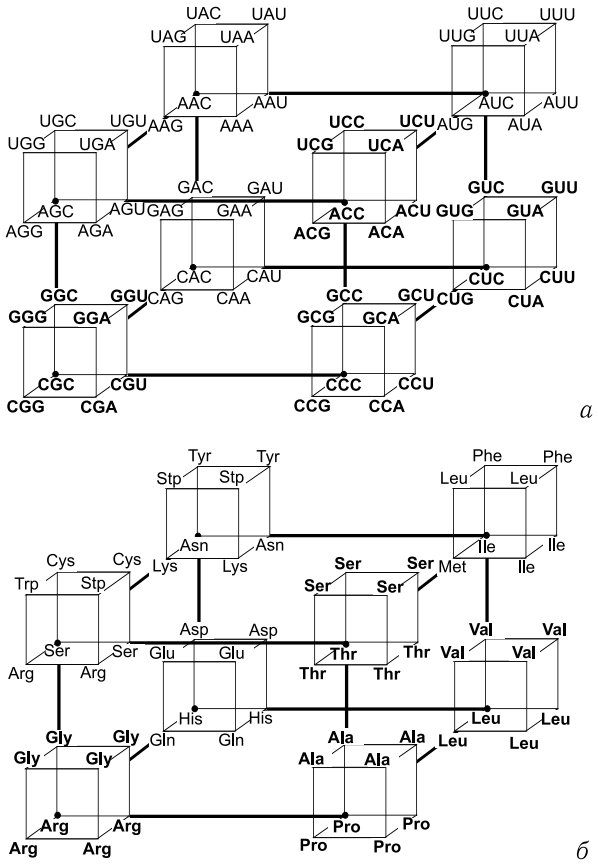


Рис. 8.26. Пространственная структура триплетного генетического кода (по [37, 41]): *а* — расположение триплетов в вершинах гиперкуба; *б* — положение аминокислот, соответствующих этим триплетам

из 6-ти переменных в триплетный топологический код. В работах [6–10], используя соответствия схемы 8.20:

$$C - 00 \quad G - 10 \quad U - 01 \quad A - 11 \tag{8.19}$$

было показано, что суперматрица (рис. 8.6) может быть трансформирована в триплетный генетический код (рис. 8.29, цветная вклейка).

В клетки этой же таблицы были вписаны кодируемые триплетами аминокислоты. Как видно на этом рисунке, вторые пары состояний, общие для каждого из четырех блоков, трансформировались во вторую букву триплетов, в последовательности: C, U, G, A. Такой же порядок имеют третьи буквы триплетов, в то время как первые буквы, кодирующие симметричные третьим парам состояния, расположены в ином порядке — C, G, U, A, что обусловлено данными правилами преобразования. Отметим также, что в результате проведенной на основе схемы 8.20 трансформации мы получили характерную для генетического кода симметрию C_2 [29, 30] двух групп кодонов: квартетов триплетов, кодирующих по одной аминокислоте (выделены жир-

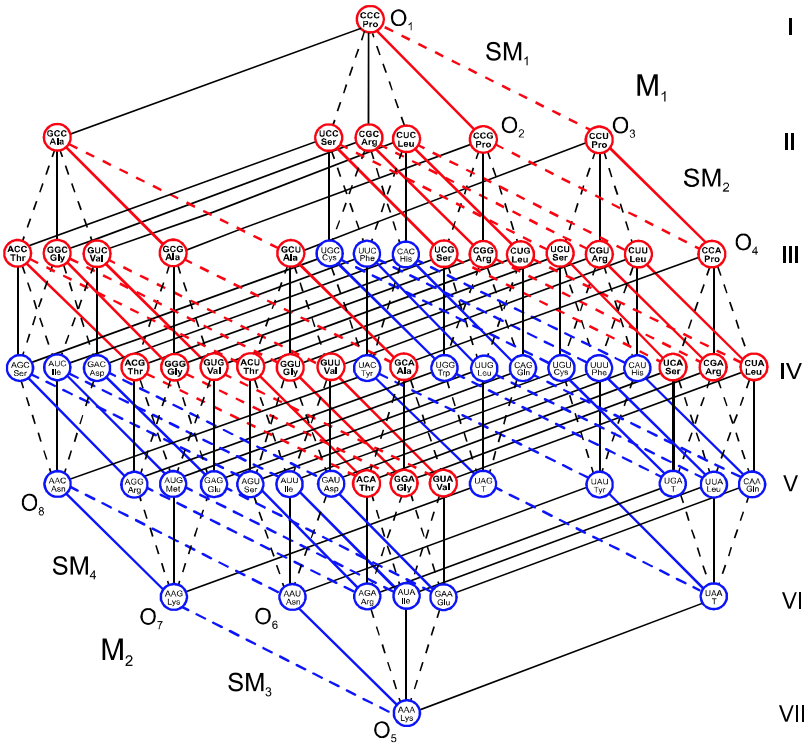


Рис. 8.27. Пространственная структура триплетного генетического кода (по [10, 34]). Сплошные линии — единичные переходы типа β (C ↔ G, U ↔ A); пунктирные линии — переходы типа γ (C ↔ U, G ↔ A). Красным цветом показаны квартеты триплетов, кодирующие по одной аминокислоте, синим — как правило, по две аминокислоты

ным шрифтом) и по две, которые отделены друг от друга утолщенной линией. Такая симметрия реализуется еще лишь в одном случае, когда имеют место соответствия 11 — C, 01 — G, 10 — U, 00 — A, предложенном в работе [37], но они, исходя из нашего подхода, приходят в противоречие со свойствами кодируемых аминокислот.

Поскольку, как мы показали, пространственной структурой суперматрицы является булев гиперкуб B^6 (раздел 8.2.1.5), то становится очевидным, что триплетный генетический код, полученный на основе соответствий схемы 8.20, должен иметь структуру, изоморфную этому гиперкубу (раздел 8.5.1.3).

8.6.3. Анализ свойств генетического кода с позиции модели. В данном разделе с позиции нашей модели топологического кодирования цепных полимеров будут проанализированы свойства генетического кода и показано, что биологический код может быть ее частным случаем.

8.6.3.1. ***Боковые цепи аминокислот как физические операторы и их соответствия триплетам генетического кода.*** Согласно нашей модели (раздел 8.4), боковые цепи полимера могут вести себя как физические операторы, воздействие которых на область формирования водородной связи может обеспечить воссоздание закодированной структуры. При этом было выделено два типа таких операторов — связности, способствующих формированию циклических структур и антисвязности,

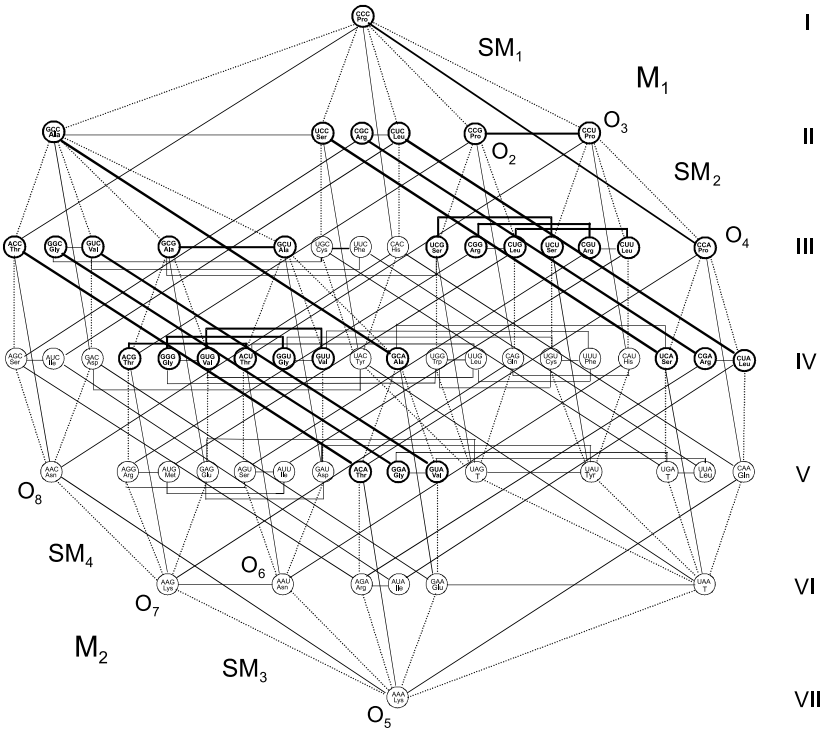


Рис. 8.28. Пространственная структура триплетного генетического кода (по [10]). Сплошные линии — единичные переходы типа α (C ↔ A, G ↔ U)

препятствующих этому процессу (раздел 8.4.1). Соответственно, операторы связности должны воссоздавать циклические конформации графа (в матрицах связность вершин i–$i-4=1$) и должны быть приписаны к блокам триплетов, кодируемых буквами G, A таблицы генетического кода, тогда как операторы антисвязности должны соответствовать блокам C, U (связность вершин i–$i-4=0$). Как показано на рис. 8.30, в самом деле, блокам G, A таблицы генетического кода соответствуют преимущественно полярные аминокислоты, способные выполнять функцию операторов связности, а блокам C, U неполярные и слабо полярные аминокислоты, пригодные на роль операторов антисвязности [10].

Как мы сформулировали в упоминали в разделе 8.4.2, набор физических операторов должен обладать единым типом стерео конфигурации (быть хирально чистым), действие операторов должно быть направлено назад, на уже синтезированную структуру (ретро-действие) и размер операторов не должен превышать размера области, на которую они действуют. Боковые цепи аминокислот белков, как известно, все относятся к L-ряду. В этом смысле они удовлетворяют требованиям нашей модели. Ретро-действие операторов было специально проанализировано нами в работе [10]. Если справедлива наша модель, то в спиральных фрагментах белков боковые цепи полярных аминокислот должны преимущественно образовывать водородные связи с O_{i-4}=C_{i-4}. В результате анализа более пятидесяти белковых структур нами были найдены циклические фрагменты, в которых боковые цепи аминокислот образуют

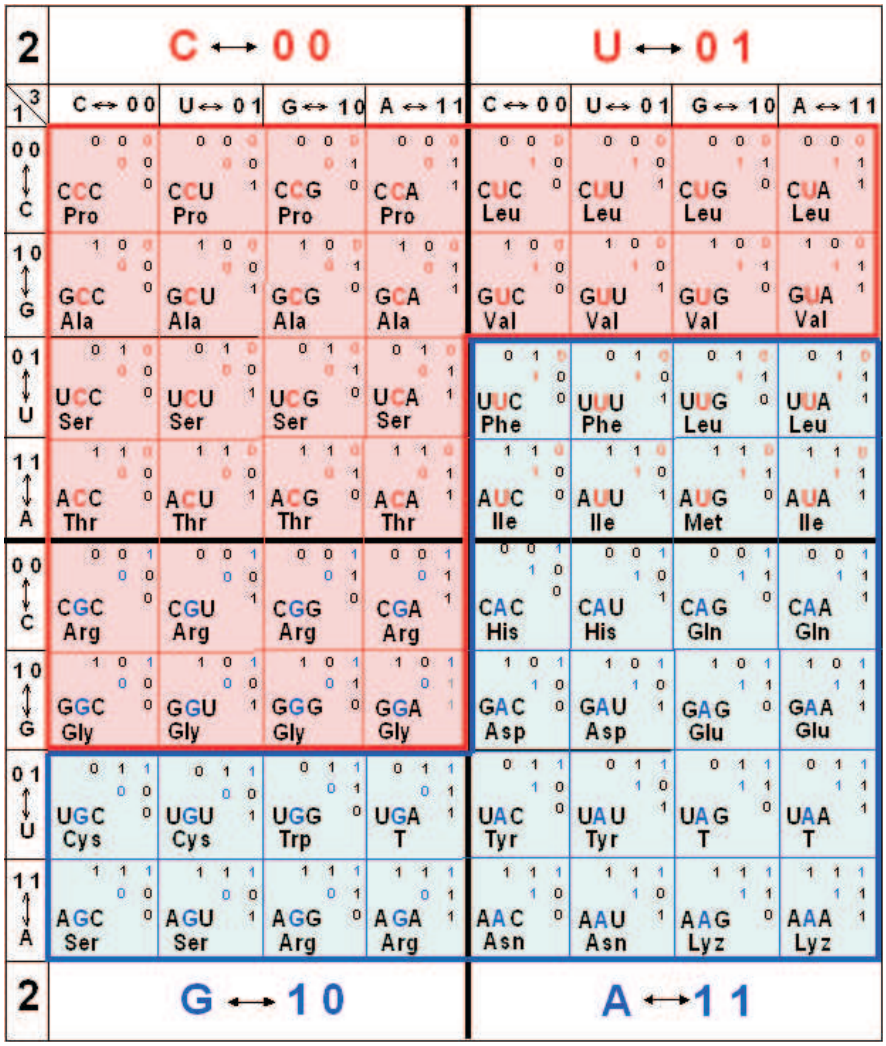


Рис. 8.29. Трансформация суперматрицы, описывающей конформации 4-х-звенного графа, в триплетный генетический код (по [9])

водородные связи с основной цепью (табл. 8.2). Конформации этих аминокислот изображены в том виде, как они были найдены в белках. Все они, как видно в табл. 8.2, образуют водородные связи $O_{i-4}{=}C_{i-4}$ карбонилом. Количество таких циклов составляет более 90 % от их общего числа, что свидетельствует в пользу нашей модели.

Из табл. 8.2 видно, что размер полярных аминокислот не превышает размера области действия физических операторов, поскольку все они образуют водородные связи с основной цепью. В этом смысле они также удовлетворяют требованиям нашей модели.

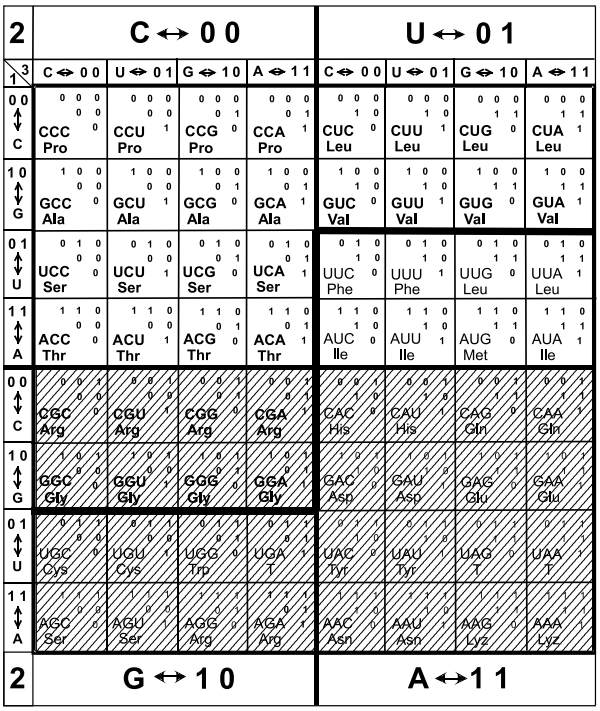


Рис. 8.30. Положение аминокислот, соответствующих операторам связности (заштрихованы) и операторам анти-связности в генетическом коде

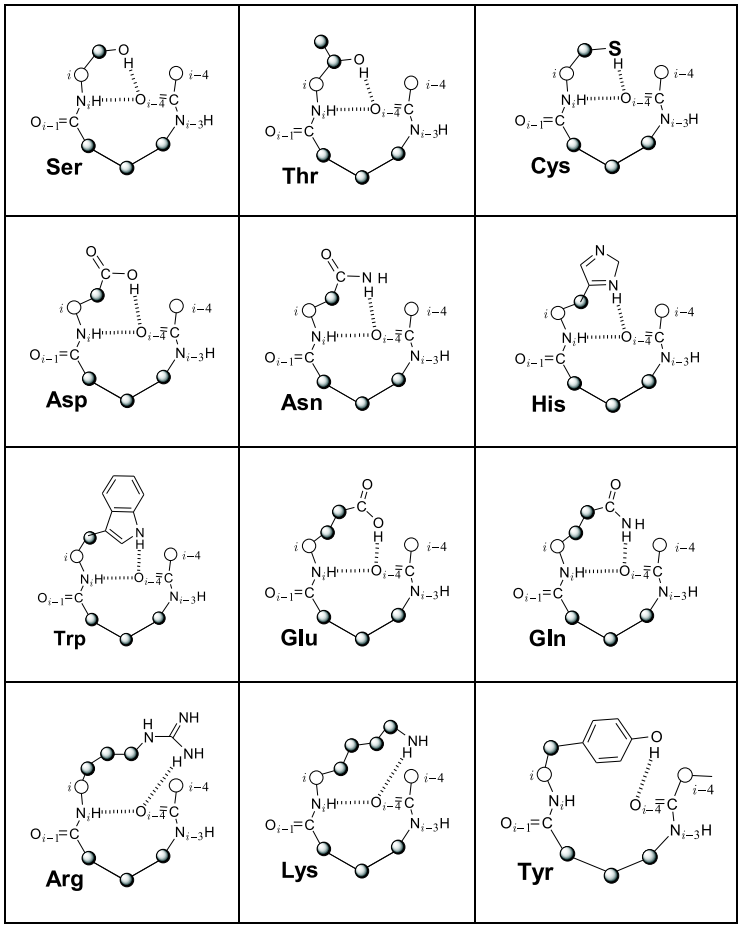
Из приведенных аминокислот только Typ обладает некоторыми особенностями. Как видно из табл. 8.2, вследствие массивности его боковой цепи, образование водородной связи с O_{i-4}=C_{i-4} приводит к разрыву водородной связи внутри цикла.

С позиции модели мы рассмотрели также боковые цепи неполярных аминокислот [10]. Поскольку действие операторов антисвязности никак не может быть зафиксировано, то мы представили их гипотетическое действие, изобразив боковые цепи с сохранением масштаба (табл. 8.3). Как видно из таблицы, Pro, который образует имино-связь, включенную в пятичленный ковалентный цикл, не способен, в принципе, сформировать 4-х-звенный цикл с участием водородной связи. С позиции нашей модели Pro можно рассматривать в качестве нулевого оператора антисвязности. При этом он должен соответствовать первой строке таблицы топологического кода. И действительно, как видно на рис. 8.29, именно Pro занимает эту строку в таблице генетического кода.

Аминокислоты Ser и Thr, вследствие небольшого размера, могут образовывать (и, по нашим наблюдением, часто образуют) водородную связь не с $(i-4)$-м карбонилом, а с $(i-3)$-м, что показано в табл. 8.3. По этой причине может образоваться не 4-х-звенный, а 3-х-звенный цикл, который соответствует, в нашем определении, ациклической конформации. Именно по этой причине Ser и Thr, с точки зрения нашей модели, попадают в таблице генетического кода в блок C (00) операторов антисвязности.

Таблица 8.2

Боковые цепи полярных аминокислот белков как возможные физические операторы связности



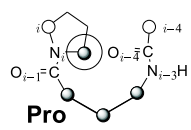
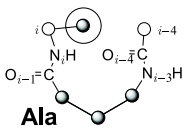
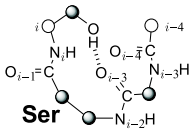
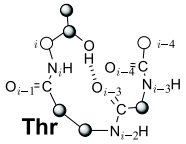
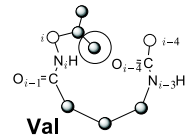
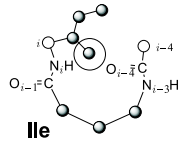
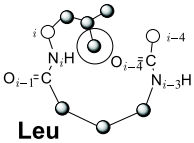
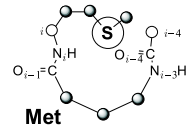
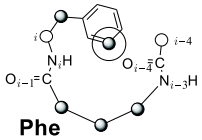
Боковые цепи аминокислот Val, Ile и Leu в β-положении имеют два заместителя, что создает препятствия для формирования замкнутого 4-х-звенного цикла. Типичным в этом отношении является боковая цепь Val, который, как известно, обладает наибольшим потенциалом при формировании β-структур [21]. В разделе 8.2.1.4 мы видели, что второй блок (01) содержит в основном конформации, соответствующие β-структуре. По этой причине Val, а также Ile и Leu должны быть приписаны, исходя из модели, к блоку триплетов, содержащих U (01) во втором положении. Сопоставление с таблицей генетического кода (рис. 8.29) показывает, что это действительно так.

Аналогичные рассуждения могут быть проведены также для Met и Phe. В целом можно сказать, что соответствие боковых цепей неполярных аминокислот триплетам генетического кода вполне удовлетворительно описывается исходя из положений нашей модели.

8.6.3.2. ***Расположение аминокислот, используемых для воссоздания симметричных конформаций.*** Как было рассмотрено в разделе 8.4.4, для воссоздания симметричных конформаций, расположенных симметрично по разные стороны от

Таблица 8.3

Боковые цепи неполярных аминокислот как возможные операторы антисвязности

 Pro	 Ala	 Ser	 Thr
 Val	 Ile	 Leu	
 Met	 Phe		

главных диагоналей блоков и описываемых симметричными матрицами, необходимы различные физические операторы (рис. 8.11). Посмотрим, как расположены боковые цепи аминокислот по отношению к главным диагоналям блоков (рис. 8.31). Из рисунка видно, что, например, в блоке U находится шесть триплетов, кодирующих Leu, но ни один из них не расположен симметрично по отношению к главной диагонали блока. То же можно сказать о блоке G, в котором находится шесть триплетов, кодирующих Arg. В блоке A близкие по размеру аминокислоты Asp и Asn, а также Glu и Gln находятся в несимметричных по отношению к главным диагоналям положениях. Таким образом, расположение боковых цепей аминокислот в таблице генетического кода не противоречит следствиям, предсказанным на основе нашей модели.

8.7. Реализация модели молекулярной векторной машины в биоструктурах

Разделение боковых цепей аминокислот на физические операторы связности и антисвязности можно рассматривать в качестве первого этапа в анализе боковых цепей аминокислот как элементов системы топологического кодирования белков. Следующим этапом, позволяющим более тонко понять свойства канонического набора аминокислот, является построение на их основе молекулярной векторной машины [19, 20].

Построение МВМ для белков, отличается от того, как это было сделано в разделе 8.5.1 для цепных полимеров. Оно было осуществлено в три этапа:

— анализ векторов, действующих на связь $N_iH\ldots O_{i-4}{=}C_{i-4}$;

— построение системы аминокислот на додекаэдре [16–18];

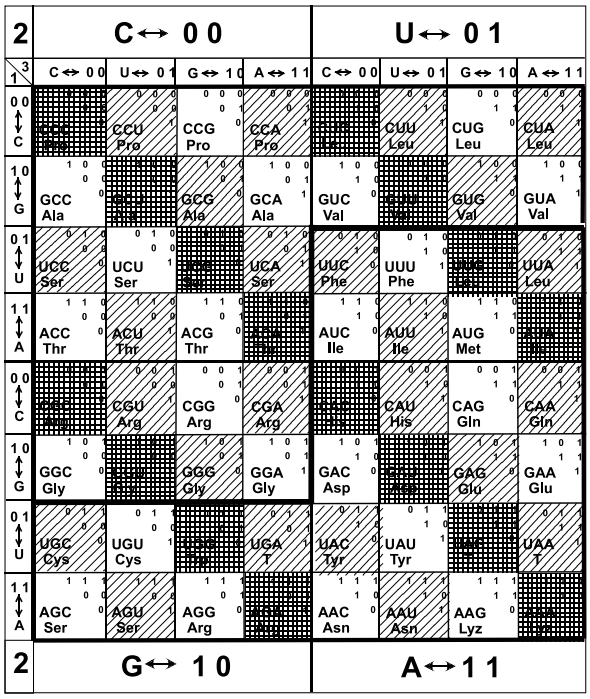


Рис. 8.31. Положение аминокислот, воссоздающих симметричные конформации, в таблице генетического кода

— перенос системы аминокислот в область связи $N_iH\ldots O_{i-4}{=}C_{i-4}$.

Анализ системы векторов, которая может сформироваться вокруг связи $N_iH\ldots O_{i-4}{=}C_{i-4}$, аналогичен анализу, проведенному в разделе 8.5.1.1. Для перехода к белкам достаточно заменить абстрактные атомы Q, R и X на конкретные атомы N, C и O, которые входят в состав пептидной группы.

Несколько сложнее обстоит дело с системой боковых цепей аминокислот. Путь, который прошла эта разработка, был достаточно извилистым [16–18], и вряд ли целесообразно подробно его описывать в этой книге. Ниже она излагается на основе обобщенной модели структуры канонического набора физических операторов (раздел 8.5.4.4).

Построенная классификация канонического набора аминокислот на додекаэдре была целиком перенесена в область действия векторов, в результате чего и была получена МВМ для белков.

8.7.1.1. ***Введение в проблему классификации канонического набора аминокислот.*** Интерес к классификации аминокислот канонического набора в последние годы существенно возрос. С одной стороны, это объясняется тем, что природа канонического набора до сих пор остается неясной [10, 44]. С другой стороны, от решения этого вопроса зависит в значительной степени и решение других проблем, в частности, связанных с самоорганизацией белковых молекул в трехмерные структуры.

Существует несколько подходов к классификации аминокислот. Наиболее общеизвестной является их классификация на основе физико-химических свойств [45]. Именно на ее основе аминокислоты были подробно рассмотрены во второй главе (раздел 2.3.4). Однако следует отметить, что боковые цепи аминокислот в отношении их принадлежности к определенным классам органических соединений достаточно разнородны. Так, Asp и Glu являются карбоновыми кислотами, Lys — первичный амин, из пяти аминокислот, содержащих циклы, Pro — алифатическая иминокислота, в то время как Phe, His, Tyr и Trp являются ароматическими соединениями. При этом физико-химический подход не может вскрыть принципы, по которым подбирались боковые цепи.

Большинство современных работ по классификации аминокислот, число которых с недавних пор стало увеличиваться, ориентируется на генетический код как на природную основу для их классификации. Характерными в этом отношении являются подходы, рассматривающие комплементарность аминокислот, закодированных комплементаными триплетами [см. обзор 46]. Меклер и Идлис, предпринявшие последовательно такой анализ, выделили три группы связных аминокислот на основе этого принципа [47]. Другая классификация аминокислот, также основанная на генетическом коде, рассматривает аминокислоты как физические операторы, воссоздающие закодированную структуру [8–12] изложена в настоящей книге. Попытка построить периодическую таблицу аминокислот, ориентируясь при этом на свойства генетического кода, предпринята в работе [48]. К триплетам генетического кода были применены методы теории групп [49]. На основе этих методов выделено четыре группы мультиплетов триплетов, кодирующих аминокислоты с разными свойствами (гидрофобные, слабо гидрофобные, гидрофильные и пролин), отнесенные к групповой симметрии SU(4). В качестве классификации аминокислот можно рассматривать и пространственные модели генетического кода, основанные на единичных заменах азотистых оснований в дуплетах и триплетах [34, 37], хотя аминокислоты в них играют подчиненную роль.

Существует ряд подходов к классификации аминокислот, появление которых в значительной степени обусловлено потребностями в разработке методов предсказания белковых структур. Так, в работе [50] предложена классификация, основанная на синтезе физико-химических и мутационных свойств аминокислот, которая была представлена в форме диаграммы Венна. В ней выделяется ряд групп аминокислот, имеющих консервативный характер в белках. На основе анализа различных типов структурных потенциалов аминокислот и матриц замещения в работе [51] предложен ряд классификаций аминокислот, полезных для сравнения эффективности того или иного метода предсказания белковых структур. Предпринимаются попытки классификации аминокислот, основанные на описании эволюции белков как марковского процесса и построении матриц скорости замен аминокислот в белках [52].

Аминокислоты также классифицируются по функциональным свойствам [53, 54]. При этом выделяются пассивные элементы (неполярные боковые цепи), формирующие изолирующее гидрофобное ядро белков, и активные элементы (боковые цепи, способные к образованию водородных связей), которые имеют различное число входов и выходов и могут участвовать в процессах переноса зарядов в белках (см. гл. 6).

Однако, вышеупомянутые подходы, как правило, не решают проблемы состава канонического набора или числа включенных аминокислот. При этом часто не обращают внимания на две особенности канонического набора. Первая из них состоит

в том, что большинство боковых цепей аминокислот представлено в наборе в виде пар, близких по свойствам, но отличающихся по длине, например: Asp–Glu, Asn–Gln, Arg–Lys, Phe–Tyr. В какой-то степени, это распространяется и на другие юоковые цепи. Вторая особенность заключается в наличии аминокислот с противоположными свойствами. Наиболее ярко она выражена для пар боковых цепей Asp^{-}–Lys^{+}, Glu^{-}–Arg^{+}, однако, своеобразно выраженные, такие свойства можно найти и для других аминокислот. До сих пор данные групповые свойства аминокислот не нашли какого-либо рационального объяснения [10, 43].

8.7.1.2. ***Модель пространственной структуры боковых цепей аминокислот на додекаэдре.*** Построенная нами модель структуры канонического набора аминокислот на додекаэдре представлена на рис. 8.32 *а*. Как и в разделе 8.5.3.4, через структуру додекаэдра проведены три взаимно перпендикулярных плоскости (I, II, III), которые являются плоскостями антисимметрии.

Боковые цепи аминокислот помещены в кружки в вершинах додекаэдра в порядке увеличения размера сверху вниз. В самом верху находится глицин (обозначен кружком с треугольником, соответствующим его α-углеродному атому), не имеющий, как известно, боковой цепи. Все остальные боковые цепи также приведены с α-углеродными атомами, расположенными вверху, над цепью. Согласно модели раздела 8.5.4.4, в плоскости I должны находиться четыре оператора с особыми свойствами. Мы расположили в пределах этой плоскости аминокислоты Gly (над плоскостью III) и Pro (под плоскостью III). Им приписываются, свойства, соответственно, нейтрального и обратного элемента. Перпендикулярно этим аминокислотам в пределах плоскости I помещены боковые цепи Ala и Leu.

Как известно, среди аминокислот встречаются пары боковых цепей близких по свойствам, но различных по длине (см. разделы 2.3.4 и 8.7.1.1). В соответствии с моделью раздела 8.5.3.4, справа от плоскости I были помещены аминокислоты с более короткой цепью, а слева, симметрично, — с более длинной цепью (рис. 8.32 *а*): Ser–Thr, Cys–Met, Asp–Glu, Asn–Gln, Arg–Lys, Val–Ile, His–Trp, Phe–Tyr. На рис. 32 *б* кружки, в которых находятся боковые цепи, закрашены справа светлее, чем слева.

Согласно модели раздела 8.5.3.4, все операторы с близкими размерами, но с гомологичными свойствами, расположены симметрично сзади и спереди от плоскости II. Боковые цепи, близкие по размерам, но гомологичные по своим свойствам, также удалось расположить таким образом. За плоскостью II находятся Ser–Thr, Asp–Glu, Val–Ile, Phe–Tyr (на рис. 8.32, в они показаны как кружки светло-розового цвета). Перед плоскостью II расположены Cys–Met (гомологи Ser и Thr), Asn–Gln (гомологи Asp и Glu) Arg–Lys (рассматриваются как гомологи Val и Ile) и His–Trp (гомологи Phe и Tyr). На рис. 8.32 *в* гомологи показаны кружками темно-розового цвета.

Наконец, модель раздела 8.5.3.4 предполагает, что операторы с противоположными свойствами должны быть расположены поворотно симметрично относительно плоскости III. Практически сформировавшаяся модель структуры канонического набора боковых цепей на додекаэдре также удовлетворяет этому требованию. В самом деле, наибольшими различиями обладают боковые цепи, расположенные в вершинах верхней и нижней грани додекаэдра: Ser–His, Cys–Phe, Thr–Trp, Met–Tyr. В то же время, боковые цепи, расположенные в экваториальной области, имеют более близкие размеры, но обладают противоположными свойствами: Asp^{-}–Arg^{+} и Glu^{-}–Lys^{+}. Нейтральные боковые цепи, способные к образованию водородных

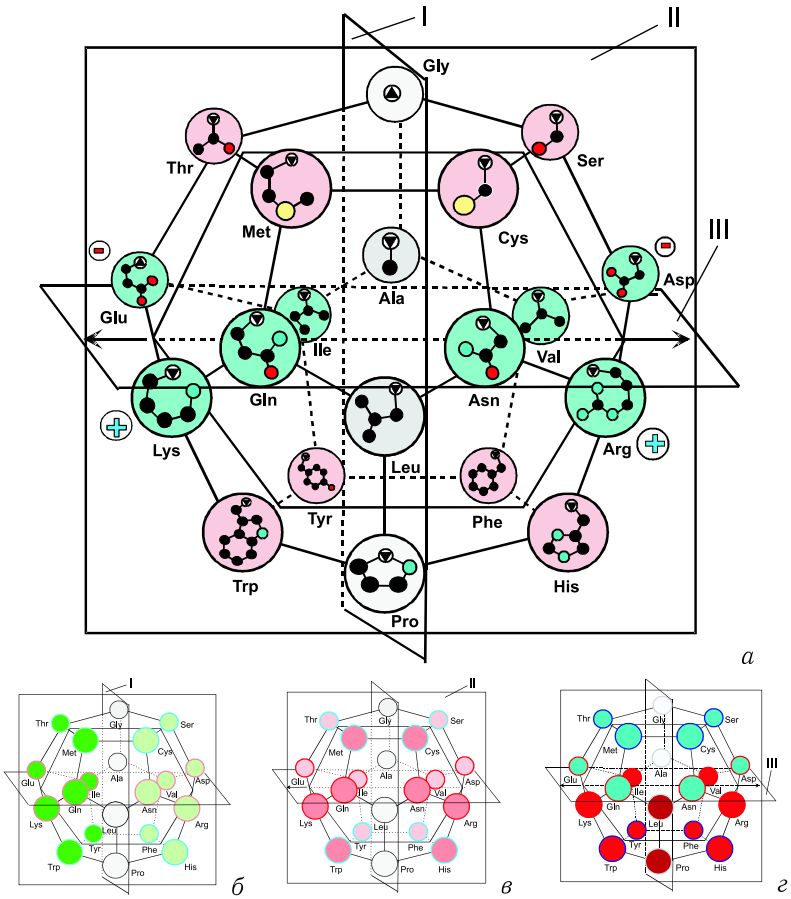


Рис. 8.32. Модель структуры канонического набора боковых цепей аминокислот на додекаэдре. I, II, III — плоскости антисимметрии. Боковые цепи аминокислот — в кружках, под ними приведены трехбуквенные обозначения аминокислот: *а* — общий вид модели. Группы, связанные преобразованиями антисимметрии, обозначены одним цветом: I и II серым; III — розовым; IV — голубым; положение антисимметричных аминокислот: *б* — близких по физическим свойствам, но различных по длине; *в* — близких по длине, но гомологичных по свойствам; *г* — противоположных по длине и свойствам

связей, оказались при этом симметричными неполярным боковым цепям: Asn–Val, Gln–Ile. На рис. 8.32 *г* положение более коротких цепей показано голубыми кружками, а противоположных по длине и физическим свойствам боковых цепей — красными кружками. Gly и Ala показаны светло-серыми кружками, а противоположные им Pro и Leu — кружками темно-красного цвета.

Аналогично преобразованиям векторов, приведенным в табл. 8.1, все антисимметричные преобразования аминокислот можно описать с помощью таблицы (табл. 8.4), причем преобразования боковой цепи в саму себя можно обозначить цифрой 1, переход через плоскость I — буквой α, через плоскость II — β, а через плоскость III — γ. Переходы, осуществляемые через несколько плоскостей, обозначены, соответственно, буквами $\alpha\beta$, $\alpha\gamma$, $\beta\gamma$, $\alpha\beta\gamma$.

Из табл. 8.4 следует, что все аминокислоты распадаются на четыре группы, показанные также на рис. 8.32, *а* цветом. Группы I и II включают по две пары аминокислот (Gly–Pro и Ala–Leu), находящиеся в плоскости I и связанные вращением относительно плоскости III (преобразование γ). На рис. 8.32. *а* кружки с этими аминокислотами выделены серым цветом. Группа III включает 8 аминокислот, связанных взаимными переходами, расположенных вблизи плоскости I додекаэдра (на рис. 8.32, *а* эти кружки окрашены розовым цветом). Наконец, в группу IV входят аминокислоты, локализованные в экваториальной области додекаэдра, вблизи от плоскости III (на рис. 8.32, *а* кружки окрашены голубым цветом).

Таблица 8.4

Преобразования антисимметрии боковых цепей аминокислот

	1	α	β	αβ	γ	αγ	βγ	αβγ
I	Gly				Pro			
	Pro				Gly			
II	Ala				Leu			
	Leu				Ala			
III	Ser	Thr	Cys	Met	His	Trp	Phe	Tyr
	Thr	Ser	Met	Cys	Trp	His	Tyr	Phe
	Cys	Met	Ser	Thr	Phe	Tyr	His	Trp
	Met	Cys	Thr	Ser	Tyr	Phe	Trp	His
	His	Trp	Phe	Tyr	Ser	Thr	Cys	Met
	Trp	His	Tyr	Phe	Thr	Ser	Met	Cys
	Phe	Tyr	His	Trp	Cys	Met	Ser	Thr
	Tyr	Phe	Trp	His	Met	Cys	Thr	Ser
IV	Asp	Glu	Asn	Gln	Arg	Lys	Val	Ile
	Glu	Asp	Gln	Asn	Lys	Arg	Ile	Val
	Asn	Gln	Asp	Glu	Val	Ile	Arg	Lys
	Gln	Asn	Glu	Asp	Ile	Val	Lys	Arg
	Arg	Lys	Val	Ile	Asp	Glu	Asn	Gln
	Lys	Arg	Ile	Val	Glu	Asp	Gln	Asn
	Val	Ile	Arg	Lys	Asn	Gln	Asp	Glu
	Ile	Val	Lys	Arg	Gln	Asn	Glu	Asp

В целом, сам факт построения системы боковых цепей аминокислот на додекаэдре на основе разработанной формальной модели раздела 8.5.3.4 свидетельствует, вероятно, об адекватности принципов этой модели свойствам канонического набора аминокислот. Это позволило нам использовать систему аминокислот при построении молекулярной векторной машины для сворачивания белков.

8.7.2. Свойства молекулярной векторной машины для сворачивания белков. 8.7.2.1 Перенос системы аминокислот в область связи $N_iH\ldots O_{i-4}{=}C_{i-4}$

Анализ области $N_iH\ldots O_{i-4}{=}C_{i-4}$-связи, проведенный аналогично разделу 8.5.1.1, выявил, по крайней мере, 20 векторов, действие которых могут воссоздавать боковые цепи аминокислот как физические операторы. Перенос системы аминокислот в эту область был легко осуществлен (рис. 8.33) благодаря тому, что структура додекаэдра, как и эта область, были разделены тремя взаимно перпендикулярными плоскостями.

В процессе переноса были сохранены лишь названия аминокислот, приписанные к соответствующим вершинам додекаэдра. Вершина додекаэдра, к которой приписана аминокислота Gly, была помещена в атом азота группы N_iH, которая соответствует NH-группе Gly, тогда как α_i-углеродный атом основной цепи совпал с α-атомом Gly.

В результате переноса структуры додекаэдра все 20 выделенных ранее векторов (10 противоположно направленных пар) оказались радиусами додекаэдра, причем одна из точек каждого вектора соответствует атому кислорода O_{i-4}, а вторая — той или иной вершине додекаэдра. Таким образом, возникла модель молекулярной «векторной машины» для белковых структур, состоящая, как и общая модель (раздел 8.5.1.2), из трех элементов:

— системы векторов внутри додекаэдра, исходящих из атома O_{i-4} как из центра;

— канонического набора боковых цепей аминокислот, прикрепляемых последовательно к α_i-углеродному атому;

— тетраэдрического α_i-углеродного атома.

Анализ свойств этих элементов упрощается, поскольку аналогичный анализ уже был проведен для общей модели (разделы 8.5.2–8.5.5).

8.7.2.1. ***Свойства векторов додекаэдра.*** Эти свойства, в принципе, уже были рассмотрены в разделах 8.5.2.1–8.5.2.2, куда мы и отсылаем читателя. Единственный момент, на который хотелось бы обратить внимание, это интерпретация свойств векторов, соответствующих нейтральному и обратному элементам. Рассмотрение этих векторов с позиции теоретико-группового подхода позволяет говорить о том, что действие вектора — нейтрального элемента, направленного в вершину под названием Gly, расположенную в атоме N_i, всегда должно приводить к формированию циклического 4-х-звенного фрагмента белка. В то же время, действие противоположного вектора — обратного элемента, всегда должно быть направлено на разрушение 4-х-звенного фрагмента. Этот вектор направлен в вершину, соответствующую аминокислоте Pro. Ниже рассмотрены особенности физических операторов, реализующих действие этих векторов.

8.7.2.2. ***Боковые цепи аминокислот как представления группы векторов.*** Согласно разделу 8.5.3.1, каждому вектору группы из 20 векторов должен соответствовать один физический оператор, воссоздающий его действие. Взгляд на боковые цепи аминокислот как на физические операторы позволяет рассматривать их в качестве неприводимых (т. е. простейших) представлений группы векторов додекаэдра. Проведение анализа боковых цепей с этих позиций позволяет в значительной

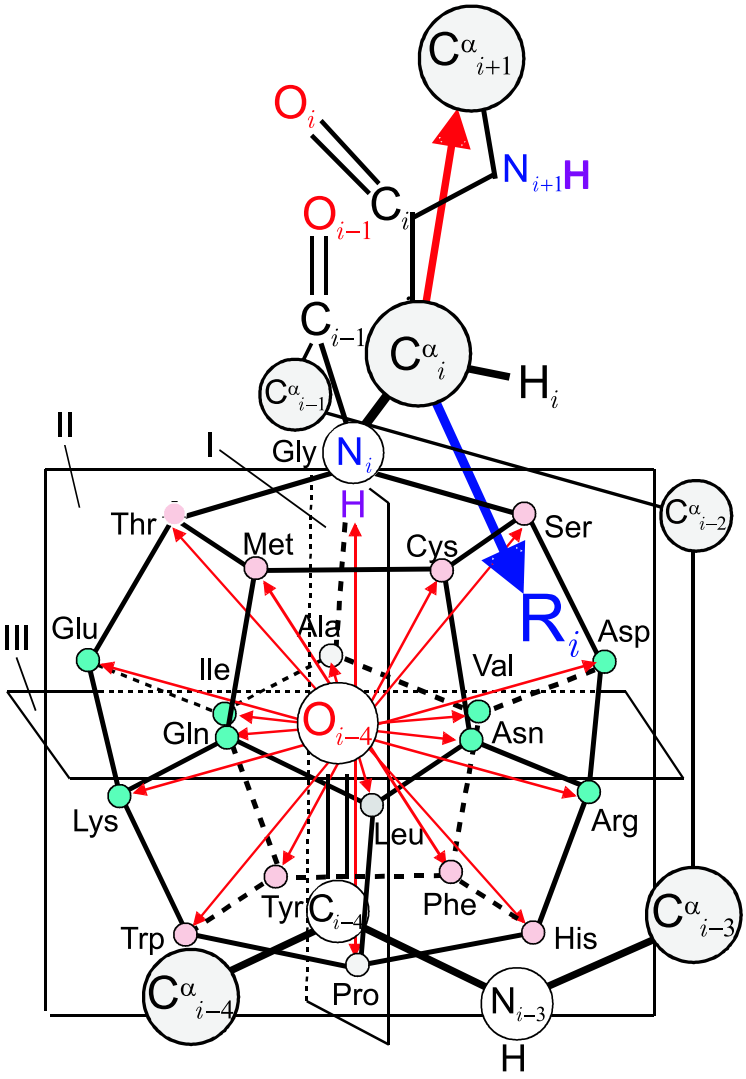


Рис. 8.33. Перенос додекаэдра с пространственной структурой канонического набора аминокислот в область связи $N_iH\ldots O_{i-4}{=}C_{i-4}$: модель молекулярной «векторной машины»

степени объяснить, почему модель структуры канонического набора боковых цепей аминокислот совпала с общей моделью структуры физических операторов.

Особые свойства аминокислот Gly и Pro. Согласно разделу 8.5.3.3, вектор, который являющийся в группе векторов нейтральным элементом, должен воссоздаваться физическим оператором, который не должен влиять на структуру 4-х-звенного фрагмента. Это означает, что такой оператор может вообще не иметь боковой цепи, а является «пустым» звеном в цепи полимера. По своим свойствам он должен относится к подгруппе операторов связности. С этой позиции особые свойства аминокислоты Gly идеально соответствуют этим требованиям. Из всего набора аминокислот только Gly не имеет боковой цепи. Отсутствие боковой цепи у этой аминокислоты

приводит к тому, что связь $N_iH\ldots O_{i-4}{=}C_{i-4}$ оказывается не регулируемой. При этом, как известно, Gly обладает большой конформационной подвижностью [21].

Вектор, соответствующий обратному элементу группы, согласно разделу 8.5.3.3, имеет противоположное действие, приводящее к разрыву связи $Q_iH\ldots X_{i-4}{=}R_{i-4}$. Его может реализовать такой физический оператор, у которого атом Q_i в принципе не может образовать водородную связь с группой $X_{i-4}{=}R_{i-4}$. Такая ситуация возможна, например, если атом Q_i заключен в циклическую структуру. В белковой МВМ этот вектор направлен в вершину, соответствующую аминокислоте Pro. Действительно, особенность этой аминокислоты состоит в том, что его атом N_i включен в пятичленный цикл и ни при каких условиях не может образовать водородную связь с группой $O_{i-4}{=}C_{i-4}$. При этом в процессе работы этой аминокислоты в качестве физического оператора атом O_{i-4} может приобрести направление, приводящее к разрушению циклической структуры 4-х-звенного фрагмента в результате «лобового» столкновения его электронной оболочки с электронной оболочкой CH_2-групп пятичленного цикла.

Длина боковой цепи должна увеличиваться по мере изменения направления вектора в сторону атома O_{i-4}. Боковые цепи аминокислот как физических операторов, воссоздающих вектора, направленные в сторону атома N_i, как это видно из рис. 8.33, должны быть короче боковых цепей, воссоздающих вектора, направленные в сторону O_{i-4}. Расположение аминокислот на модели структуры канонического набора аминокислот в порядке увеличения размера обеспечило реализацию этого требования МВМ.

Боковые цепи аминокислот, воссоздающие вектора, направленные вправо от плоскости I, должны быть более короткими. Положение $C^{\alpha}{}_i$-атома к которому прикрепляются боковые цепи аминокислот как физические операторы в МВМ белка, как видно на рис. 8.33, несколько асимметрично и сдвинуто вправо относительно связи $N_iH\ldots O_{i-4}{=}C_{i-4}$ (сравните с разделом 8.5.3.3). Это означает, что боковые цепи, воссоздающие вектора, направленные вправо от плоскости I, должны быть короче, чем боковые цепи, реализующие действие векторов, направленных влево от этой плоскости. Данная закономерность должна появляться в отношении всех боковых цепей, что должно приводить как формированию из них двух групп, обладающих близкими свойствами, но разной длиной. Именно поэтому канонический набор аминокислот состоит из двух групп, которые удалось расположить на додекаэдре симметрично относительно плоскости I.

Близкие по размеру, но разные по свойствам боковые цепи должны воссоздавать вектора, расположенные симметрично по отношению к плоскости II. Как видно на рис. 8.33, расстояние от $C^{\alpha}{}_i$-атома до вершин, в которые направлены вектора, находящиеся за плоскостью II, (направлены от нас), и перед плоскостью II (направлены к нам), различаются не очень сильно. По этой причине боковые цепи, воссоздающие эти вектора, не должны существенно различаться в размере. Их различия могут состоять лишь в замене терминальных групп. И действительно, пары аминокислот, расположенные перед плоскостью II и за ней, близки, что было отмечено при обсуждении модели структуры аминокислот (раздел 8.7.1.2).

Более короткие боковые цепи аминокислот воссоздают вектора, расположенные над плоскостью III. Как видно на рис. 8.33, вершины векторов, направленных в сторону группы $HN_i{-}C{=}O_{i-1}$, расположенные над плоскостью III, находятся значительно ближе в $C^{\alpha}{}_i$-атому, чем направленных в противоположную сторону, к атому C_{i-4} (находится под плоскостью III). По этой причине все вектора, находя-

щиеся над плоскостью III, должны воссоздаваться более короткими боковыми цепями аминокислот (физическими операторами), чем находящиеся под плоскостью III. Поскольку эти вектора связаны операцией вращения вокруг оси $C_2(\gamma)$, то аминокислоты с самыми короткими боковыми цепями должны противостоять самым длинным. В то же время боковые цепи, воссоздающие вектора, расположенные в экваториальной области додекаэдра должны отличаться в меньшей степени, например, на одно звено в цепи. Именно это мы наблюдаем в структуре канонического набора аминокислот. Становится понятным, почему существует такая антисимметрия в этой структуре.

Свойства боковых цепей, воссоздающих вектора противоположного направления. Боковые цепи, воссоздающие вектора противоположного направления, должны обладать дополнительными свойствами. Это связано с тем, что наклон оси этих векторов один и тот же вместе составляют его диаметр. При этом, поскольку диаметры соединяют вершины додекаэдра, расположенные по разные стороны от плоскости I, то те боковые цепи, находящиеся на одной оси, которые находятся справа от плоскости I будут максимально приближены к C^{α}_i-атому, а слева от этой плоскости — максимально удалены от C^{α}_i-атома. Это позволяет понять, почему в структуре аминокислот (рис. 8.32) в вершинах додекаэдра, соединенных диаметрами, находятся боковые цепи, свойства которых дополнительны: самая короткая полярная цепь Ser связана с самой массивной — Trp, меньшая, по сравнению с Trp цепь His связана с более массивной, по сравнению с Ser, цепью Thr. Минимальная по размеру отрицательно заряженная боковая цепь Asp находится на одном диаметре с максимальной по длине положительно заряженной цепью Lys, а более короткая цепь Arg связана с большей по длине Glu, и т. д. Можно ожидать, что направление C^{α}_i–C_{i+1}, задаваемое каждой из боковых цепей, воссоздающих вектора одинакового наклона, должно быть одно и тоже.

В заключение раздела отметим, что сделанные на основе анализа МВМ выводы можно проверить с помощью данных, полученных при РСА белков. В основном это касается операторов связности, образующих водородные связи с O_{i-4}-атомом. Эти данные приведены в следующей главе (раздел 9.2.3).

8.7.2.3. ***Свойства тетраэдрического C^{α}_i-атома.*** Общие свойства тетраэдрического α-атома, описанные в разделе 8.5.4, полностью могут быть отнесены и к свойствам C^{α}_i-атомам белковой цепи. Для этого достаточно заменить, как и ранее, буквы Q, R и X на конкретные обозначения атомов — N, C и O. По этой причине мы, как и выше, отсылаем читателя к этому разделу. В настоящем разделе можно сделать лишь несколько небольших дополнений.

Первое дополнение касается структуры МВМ, которая возникает при формировании водородных связей $N_{i+1}H$ группы белка с основной цепью. Очевидно, что при образовании связи $N_{i+1}H\ldots O_{i-3}$ будет воспроизводиться структура α-спирали и структура МВМ останется неизменной. Однако уже при образовании связи $N_{i+1}H\ldots O_{i-2}$ в этой области будет происходить редукция. Хотя для большей точности необходимо провести тщательную работу по определению этой структуры, предварительный анализ более сотни белков показал, что в этой области практически не обнаруживаются такие аминокислоты как Gln, Lys, Tyr, Trp, т. е. именно те, которые занимают левый нижний край додекаэдра в МВМ, что было предсказано в разделе 8.5.4.2. Что касается образования связи $N_{i+1}H\ldots O_{i-1}$, то крутизна этого участка такова, что не позволяет МВМ вписаться в эту область, за исключением

фрагмента самой цепи. И действительно, в этой области встречается практически только одна аминокислота — Gly [21].

Второе дополнение касается формирования групп боковых цепей, задающих одинаковое направление связи $C^{\alpha}{}_i$–C_{i+1}. Интуитивно кажется вероятным, что такое направление должны задавать боковые цепи, воссоздающие симметричные вектора. Например, такую группу образуют аминокислоты как Asp, Glu, Lys, Arg. Действительно, эти аминокислоты часто встречаются в α-спиральных участках [21] и можно ожидать, что они детерминируют направление $C^{\alpha}{}_i$–C_{i+1}, способствующее образованию связи $N_{i+1}H\ldots O_{i-3}$. Однако, чтобы избежать ошибки, необходимо теоретически изучить все возможные варианты поворотов «коромысла» (т. е. системы боковая цепь R_i — направление $C^{\alpha}{}_i$–C_{i+1}). Такая работа нами в настоящее время ведется, однако окончательные результаты пока не получены.

Наконец, третье дополнение связано с учетом вариантов, связанных с переходом не только от структуры со связью $N_iH\ldots O_{i-4}$ к связи $N_{i+1}H\ldots O_{i-2}$ или $N_{i+1}H\ldots O_{i-1}$, но и в противоположном направлении, т. е. от связи $N_{i+1}H\ldots O_{i-1}$ к $N_{i+1}H\ldots O_{i-2}$ или от связи $N_{i+1}H\ldots O_{i-2}$ к связи $N_iH\ldots O_{i-4}$. Эти варианты нами пока не рассматривались. Можно ожидать, что в этом случае возникнет проблема сложения векторов. Во всяком случае, необходимость в анализе этих вопросов существует.

8.7.3. Вырожденность свойств боковых цепей аминокислот и вырожденность триплетов генетического кода. Двухъярусная модель МВМ. В нашей модели, как мы уже отмечали (раздел 8.5), было выделено лишь двадцать векторов и двадцать физических операторов для их воссоздания. В то же время, в топологическом коде возможно существование порядка 62-х значащих триплетов, кодирующих 62 конформации цепного полимера. Им должно соответствовать 62 вектора, для воссоздания которых нужно 62 физических оператора. Для решения этого несоответствия было предположено, что боковые цепи физических операторов должны обладать вырожденными состояниями, которые и обеспечивают воссоздание все конформации топологического кода. В современном генетическом коде лишь три триплета являются стоп-кодонами (кодируют окончание синтеза), а остальным триплетам соответствуют определенные аминокислоты [23–25]. При этом код является вырожденным и одной аминокислоте в коде часто соответствует несколько значащих триплетов. Так, большинство полярных аминокислот, содержащих резонансные группы в боковой цепи (гл. 5), кодируется двумя триплетами. Перечислим их, глядя на таблицу генетического кода (рис. 8.29): His, Gln, Asp, Glu, Tyr, Asn. В разделе 8.5.4.5 мы предположили, что поскольку большинство операторов связности может иметь два варианта водородных связей, этим вариантам должны соответствовать две конформации, закодированные триплетами. Для блока A эта идея вполне оправдывается.

В то же время, в блоке G боковая цепь Arg кодируется шестью триплетами. Если наше предположение справедливо, то эта аминокислота должна иметь не два, а шесть вариантов водородных связей. Для проверки этого с помощью программы Protein 3Dмы предприняли детальный анализ 4-х-звенных циклов, образованных боковой цепью Arg. Результаты этого анализа будут приведены полностью в гл. 9. Здесь же мы показываем лишь варианты водородных связей, образованные боковой цепью Arg с O_{i-4}-атомом (рис. 8.34). Для сопоставления, вверху приведены все триплеты, кодирующие Arg. Четыре триплета, кодирующих Arg, содержат дуплет CG, и два

триплета — дуплет AG. Последние два, очевидно, имеют наибольшую связность (111 010 и 111 011).

Анализ водородных связей, образованных боковой цепью Arg, который мы провели, позволил нам обнаружить в белках следующие шесть вариантов этих связей: NE; NH1; NH2; NE,NH1+NE,NH2; NH1,NH2; NE,NH1,NH2 (рис. 8.34). Варианты NE,NH1 и NE,NH2 были практически идентичны и их объединили. Степень распространения различных типов циклов достаточно сильно различается (см. гл. 9).

Как видно на рис. 8.34, все эти варианты, как и предсказывает модель MBM, если смотреть на них в профиль, имеют наклон водородной связи вправо. Если же взглянуть на водородные связи Arg связи сверху (рисунки даны в 9-й главе), то все они, как и ожидалось согласно MBM, расположены справа от плоскости I. Наибольшей связностью обладают, вероятно, варианты д и е. В целом, как мы и предполагали, шести триплетам, кодирующим аминокислоту Arg соответствует шесть возможных сочетаний водородных связей, образуемых его боковой цепью. Однако, вопрос о том, существует ли корреляция между тем или иным триплетом и тем или иным сочетанием водородных связей боковой цепи, в частности для Arg, требует дальнейшего изучения. Такой связи может и не быть, поскольку, в отличие от соответствия триплет — аминокислота, которое задается в последовательности триплетов, однозначной связи между вырожденностью триплетов и типом водородной связи боковой цепи нет.

Специального обсуждения требует вопрос о вырожденности неполярных боковых цепей. В генетическом коде степень вырожденности триплетов, кодирующих эти цепи, варьирует от шести для Leu до трех для Ile. В отличие от водородных связей, вопрос о различных состояниях этих боковых цепей не так ясен. Тут можно высказать такое соображение, что из всех неполярных цепей боковая цепь Leu, благодаря присутствию β-CH_2-группы, может иметь наибольшее число конформаций. При соударении с O_{i-4}-атомом может возникнуть пучок векторов, соответствующий шести триплетам кода. В то же время, остальные неполярные цепи могут создавать меньшее число конформаций и воссоздавать меньшее число векторов.

В целом, как мы полагаем, высказанные предположения приводят нас к модели двухъярусной структуры MBM (раздел 8.5.4.5), в которой в качестве нижнего яруса может служить ромбоикосододекаэдр (рис. 8.18). Однако дальнейшее обсуждение этого вопроса предполагает построение такой MBM на основе реальных данных. Существенных препятствий к разработке этого вопроса, кроме чисто технических проблем, на наш взгляд, нет.

8.7.4.1. ***Принципы построения системы модулей.*** Основные идеи относительно систематизации функциональных групп боковых цепей цепных полимеров были сформулированы в разделе 8.5.5. В применении к боковым цепям аминокислот эти идеи могут быть существенно конкретизированы. Резонансная группа HN_{i-3}–C_{i-4}=O_{i-4}, из атома O_{i-4} которой исходят все вектора MBM белков, входит, как известно в состав ССИВС (систем HN-C=O-групп) и участвует в формировании базовой архитектуры белков (см. гл. 6). Если при этом вектора рассматривать не только как направления действия боковых цепей при ко-трансляционном сворачивании белка, но и как «сигналы», направленные из атома O_{i-4} на входы этих групп, то последние будут выступать в качестве функциональных модулей [53, 54]. В разделе 6.2.2 боковые цепи аминокислот уже рассматривались как элементы

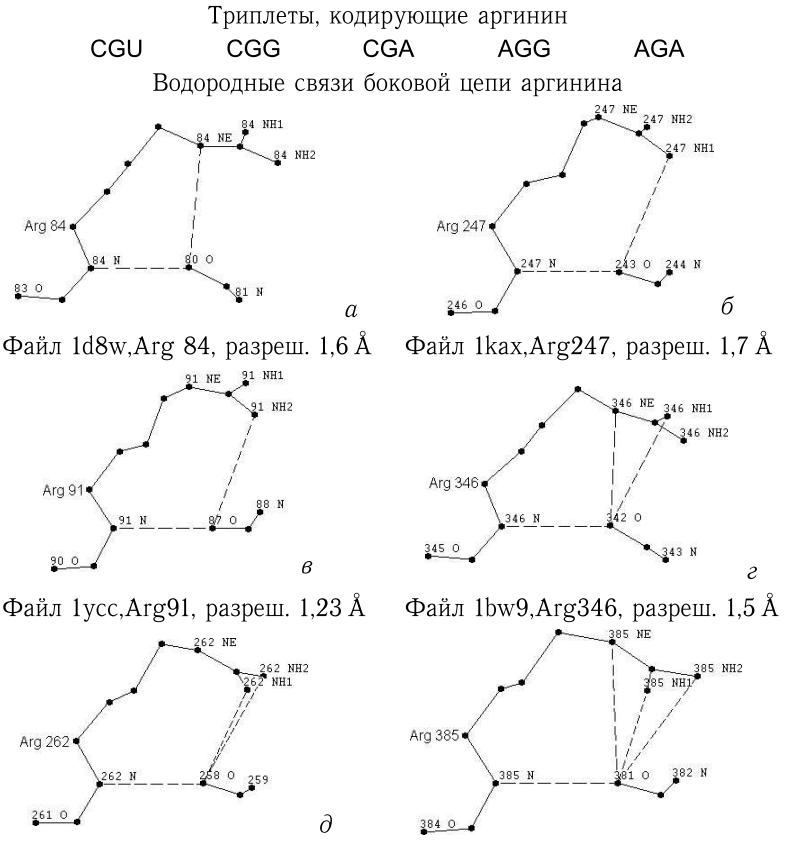


Рис. 8.34. Триплеты, кодирующие Arg, и варианты водородных связей, образованные атомами боковой цепи Arg с O_{i-4}-атомом: *а* — NE; *б* — NH1; *в* — NH2; *г* — NE,NH1+NE,NH2; *д* — NH1,NH2; *е* — NE,NH1,NH2

ССИВС. Использование МВМ позволяет провести такой анализ и глубже понять особенности боковых цепей аминокислот как функциональных модулей. Результаты анализа представлены в виде структуры додекаэдра с помещенными в его вершины функциональными группами боковых цепей аминокислот (рис. 8.35). Атомы водорода, на которые ориентированы стрелки рассматриваются как входы (см. раздел 6.1.1), а неподеленные пары электронов (для простоты на рисунке не показаны) соответствуют выходам и обозначены стрелками, исходящими из модулей.

В разделе 8.5.5.1 мы выяснили, что вырожденность состояний терминальных групп, связанная с изменением направления векторов, не влияет на их функции, вследствие чего количество боковых цепей аминокислот и их функций достаточно близко совпадает.

8.7.4.2. ***Анализ терминальных модулей как неприводимых представлений группы векторов.*** **Функции Gly и Pro.** Согласно разделу 8.5.3.2, теоретико-групповой подход предполагает наличие в группе нейтрального и обратного элементов. Связывая функции нейтрального элемента с механизмом переноса зарядов

можно сказать, что нейтральный элемент не должен, вероятно, влиять на процесс переноса заряда, тогда как обратный элемент должен препятствовать этому. В самом деле, аминокислота Gly, которой мы приписали функции нейтрального элемента, не содержит боковой цепи, а его аминогруппа участвует в образовании пептидной связи основной цепи белка (HN_i–C_{i-1}=O_{i-1}-группы). Эта группа практически не влияет на процесс переноса заряда по системе HN_{i-3}–C_{i-4}=O_{i-4}… HN_i–C_{i-1}=O_{i-1} и действительно может считаться нейтральным элементом.

Аминокислота Pro наоборот, как видно на рис. 8.35, не содержит входов, так как атом азота его N_i–C_{i-1}=O_{i-2}-группы включен в цикл. В то же время, его O_{i-2}-атом, содержащий неподеленные пары электронов, может служить основой для инициации ССИВС (см. раздел 6.2.2). Цикл Pro обусловливает прерывание цепи HN–C=O-групп в белке, т. е. функция Pro является обратной роли Gly.

Функции других неполярных боковых цепей. Неполярные боковые цепи (Leu, Ala, Val, Ile), которые не изображены на рис. 8.35, на наш взгляд, имеют функции, аналогичные Pro, хотя направление действующих векторов несколько отличается от Pro. Согласно разделу 6.2.2, они играют роль пассивных элементов, создающих гидрофобную среду для ССИВС.

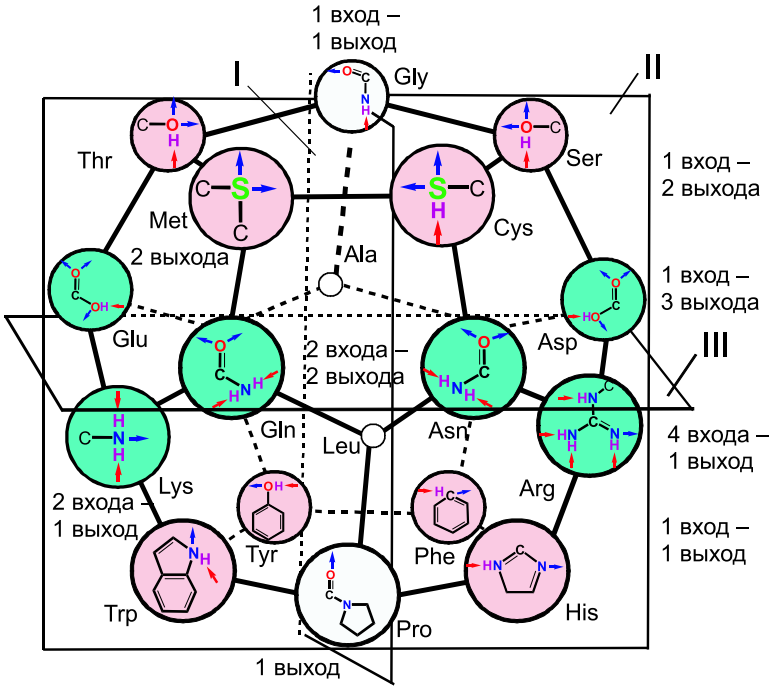


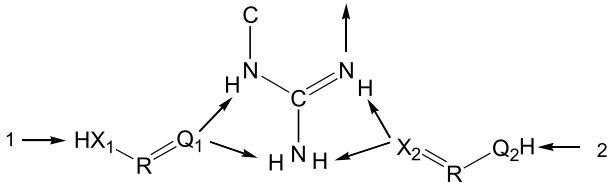
Рис. 8.35. Система функциональных групп аминокислот как модулей ССИВС, построенная на додекаэдре. Входы и вектора обозначены синими стрелками, выходы — красными стрелками. Кружки с функциональными группами, связанными взаимными преобразованиями, обозначены: пара Gly–Pro — светло серым цветом; группа III — розовым; группа IV-голубым

Свойства боковых цепей — активных модулей ССИВС. Как мы показали в разделе 8.5.2.1 в структуре МВМ две пары векторов находятся в плоскости I, тогда

как остальные 16 векторов образуют две группы, по 8 векторов в каждой, связанные преобразованиями симметрии (табл. 8.1). Аналогичные взаимосвязи боковых цепей аминокислот показаны в табл. 8.4. Поскольку терминальные группы выступают в качестве представлений векторов, то их функции также могут быть заданы этими преобразованиями, т. е. пара Gly–Pro в плоскости I и две группы по 8 модулей, связанных взаимными преобразованиями. На рис. 8.35. кружки с функциональными группами, связанные этими преобразованиями, обозначены как на рис. 8.32 *а*.

Для построения системы модулей, исходя из этой логики, можно исходно задать лишь 4 основных функции (в плоскости I — две и для каждого октета — по одной), остальные же функции будут получаться путем их симметричного преобразования. Все эти соображения мы попытались реализовать в применении к боковым цепям аминокислот.

Как следует из рис. 8.35, при переходе через I плоскость функции модулей справа и слева от этой плоскости в большинстве случаев не меняются. В частности, C–OH-группы Ser и Thr, имеют 1 вход — 2 выхода, O–C=OH-группы Asp и Glu — 1 вход и 3 выхода, O–C=NH_2-группы Asn и Gln — 2 входа и 3 выхода. Особенностью боковых цепей Lys и Arg является то, что Lys представлен простой группой C–NH_2, а второй — системой, состоящей из резонансных групп N–C=N. Для Lys можно выделить 2 входа и 1 выход. В то же время, гуанидиновая группировка Arg, как видно на рис. 8.35, потенциально имеет 4 входа и 1 выход. Однако, анализ структур, содержащих Arg, показал, что атомы водорода гуанидиновой группировки часто образуют водородные связи парами, т. е. согласно схеме 8.21:



. (8.20)

В этом случае гуанидиновая группировка связывает лишь две системы, работающие на входы, и, как видно на схеме, практически она выполняет функции элемента, имеющего 2 входа и 1 выход.

Функции циклических боковых цепей справа и слева от плоскости I также близки. Боковые цепи Trp и His имеют по одному входу и одному выходу в пятичленный цикл (у Trp добавляется еще шестичленный цикл). Аналогично боковые цепи Tyr и Phe также могут иметь один вход и один выход, но шестичленный цикл. При этом особенностью Phe является отсутствие гетеро атома с атомом водорода, которому можно было бы приписать функцию входа, потому ее, по-видимому, может выполнять какой-либо атом углерода этого цикла.

Несколько иначе ведут себя функции боковых цепей при переходе через плоскость II. Так, в модулях, расположенных в верхней части додекаэдра (над плоскостью III) при переходе через плоскость II происходит замена гетероатомов (C–O → C–S, O–C=O → N–C=O), что сопровождается изменением их свойств. Например, при переходе от Thr к Met в Met остаются только выходы, а при переходе от Ser к Cys увеличивается подвижность атома водорода. Модули Asp и Glu имеют 1 вход — 3 выхода, а симметричные относительно плоскости II модули Asn и Gln содержат 2 входа и 2 выхода. В нижней части додекаэдра также происходит изменение

свойств модулей относительно плоскости II. Модулям Lys и Arg, содержащим по 2 выхода и 1-му входу, соответствуют боковые цепи Ile и Val, не имеющие активных групп, а пятичленные модули Trp и His меняются на шестичленные — Tyr и Phe.

Плоскость III (см. рис. 8.35) имеет ось вращения второго порядка (C_2), вследствие чего модули верхней и нижней части додекаэдра относительно этой плоскости обладают поворотной симметрией. При этом модулям с простыми группами C–O и C–S, имеющим 1 входом и 2 выхода, соответствуют при переходе через плоскость III, циклические модули с 1-м входом — 1-м выходом, обладающие функциями элементов инверсии (HE) и задержки (см. раздел 6.2.2). Например, Ser — His, Cys — Phe, Thr — Trp. В то же время, модулям Glu, Asp, имеющим 1 вход — 3 выхода соответствуют модули Lys и Arg, имеющие 2 входа — 1 выход. Модулям Gln и Asn с 2-мя входами — 2-мя выходами соответствуют боковые цепи Ile и Val, не имеющие активных группировок. Иными словами, при переходе через плоскость III происходит обращение (инверсия) функций модулей.

Таким образом, использование додекаэдра, элемента МВМ, для систематизации боковых цепей как функциональных модулей ССИВС позволило выявить особенности поведения этих модулей относительно трех плоскостей антисимметрии. Переход через плоскость I не сопровождается изменением их функций, при переходе через плоскость II эти функции изменяются постепенно, а при переходе через плоскость III происходит их обращение. Особенности канонического набора боковых цепей аминокислот как функциональных модулей, выявленные с помощью этой модели, могут быть использованы как при конструировании на основе этих модулей логических схем, так и при создании других систем модулей, пригодных для конструирования устройств бионической наноэлектроники.

8.8. Значение модели топологического кодирования цепных полимеров, перспективы ее развития и применения

В данной главе показано, что реализация принципа непрерывности ССИВС в цепных полимерах зависит от наличия в цепи боковых цепей. Если размер и свойства боковых цепей позволяет им влиять на структуру спиралей, содержащих ССИВС, как в сторону стабилизации, так и в сторону разрушения, то в структуре такой спирали могут появиться дефекты, которые могут менять направление ее фрагментов и способствовать определенной укладке этих фрагментов в третичную структуру. На этой основе была развита модель топологического кодирования цепных полимеров, которая состоит из трех элементов: топологического кода, алгоритма кодирования и системы физических операторов. В первой части главы были изложены теоретические основы этой модели, а во второй конкретные ее приложения к биоструктурам, а именно, к генетическому коду и белкам.

Было показано следующее:

— предложен топологический код, созданный на основе описания конформаций 4-х-звенного графа, который является математическим аналогом генетического кода;

— введены понятия физических операторов связности и антисвязности, воссоздающих циклические и ациклические конформации 4-х-звенного фрагмента полимера. В первом приближении с их помощью объяснена природа соответствий триплетов определенным типам боковых цепей аминокислот;

— предложена модель молекулярной векторной машины (МВМ), в рамках которой боковые цепи рассматриваются как система неприводимых представлений, воссоздающих группу векторов, определяющих конформацию цепного полимера. В рамках этой модели нашли объяснение многие свойства боковых цепей канонического набора аминокислот.

— на основе модели МВМ проведен анализ функциональных групп боковых цепей аминокислот как модулей ССИВС. Показано, что система из 20 модулей может быть получена из четырех основных модулей путем их преобразования относительно плоскостей антисимметрии.

Полученные результаты, как нам представляется, имеют важное теоретическое значение, поскольку показана связь между структурой генетического кода, системой боковых цепей аминокислот и конформацией белковой цепи. Однако, описанный в данной главе алгоритм, как будет показано далее, оказался не вполне полноценным. Как мы показали в разделе 8.5.4, это связано с тем, что в структуру алгоритма должно входить не только описание конформации, закодированной триплетом, но и описание конформации $i+1$-го звена, которое задается тетраэдрическим α_i-атомом. Установление этой связи в работающем «коромысле» растущей белковой цепи — одна из важнейших проблем на ближайшую перспективу. В качестве дальнейшей перспективы можно наметить детальную разработку алгоритма кодирования и декодирования цепных полимеров и его применение к белковым цепям.

Некоторые из полученных результатов уже сейчас могут найти применение. Так, построенная на основе МВМ модель структуры канонического набора физических операторов (раздел 8.5.4.4) может быть использована для разработки конкретных систем физических операторов для целей органической наноэлектроники. Аналогичным образом, система функциональных групп аминокислот, описанная в разделе 8.7.4.1 может служить прототипом для разработки других систем наноэлектроники.

Теоретические разработки, так или иначе, должны проверяться реальными экспериментальными данными. Не является исключением и наша модель топологического кодирования цепных полимеров, конкретным примером которых являются белки. Имеющиеся данные, полученные на белках, которые могут служить подтверждением сформулированных в этой главе идей, приведены в следующей главе.

Литература к главе 8

1. *Perutz M.F.* New x-ray evidence on the configuration of polypeptide chains // Nature. 1951. V. 167. P. 1053–1054.
2. *Dill K.A.* Dominant forces in protein folding // Biochemistry. 1990. V. 29. P. 7133–7155.
3. *Creghton T.E.* Proteins: Structure and Molecular Properties. 2-nd ed. — N. Y.: W. H.Freeman, 1993.
4. *Страйер Л.* Биохимия. В трех томах. Пер. с англ. — М.: Мир, 1984. Т. 1. — 232 с.; 1985. Т. 2. — 308 с.; 1985. Т. 3. — 397 с.
5. *Stickle D.F.*, *Presta L.G.*, *Dill K.A.*, *Rose G.D.* Hydrogen bonding in globular proteins // J. Mol. Biol. 1992. V. 226. P. 1143–1159.
6. *Карасев В.А.* Как закодировать топологию биочипа? // Биотехнология. 1998. № 3. С. 62–75.
7. *Карасев В.А.*, *Лучинин В.В.* Проблемы создания искусственных бионических микро- и наносистем // Известия вузов. Электроника. 1998. № 6. С. 5–15.
8. *Karasev V.A.*, *Demchenko E.L.*, *Stefanov V.E.* Topological coding of polymers and protein structure prediction // In: Chemical topology: applications and techniques. (D. Bonchev, D. Rouvray eds.). Ser. Math. Chem. 2000. V. 6. P. 295–345. — New–York–London–Paris et al.: Gordon & Breach.
9. *Карасев В.А.*, *Лучинин В.В.* Молекулярная архитектура органических сенсорных наносистем // Петербург. ж. электроники. 2001. № 4. С. 12–32.
10. *Karasev V.A.*, *Stefanov V.E.* Topological nature of the genetic code // J. Theor. Biol. 2001. V. 209. P. 303–317.
11. *Karasev V.A.*, *Luchinin V.V.*, *Stefanov V.E.* Topological coding: Towards new materials for molecular electronics // Adv. Funct. Mater. 2002. № 12. P. 461–469.
12. *Карасев В.А.* Генетический код: новые горизонты. — СПб: Тэсса, 2003. — 145 с.
13. *Bochmann D.*, *Posthoff Ch.* Binare Dynamische Systeme. — Berlin: Akademie–Verlag, 1981. — 400 s.
14. *Яблонский С.В.* Введение в дискретную математику. — М.: Наука, 1986. — 384 с.
15. *Горбатов А.В.* Основы дискретной математики. — М: Высшая школа, 1986. — 311 с.
16. *Карасев В.А.* Об антисимметриях канонического набора аминокислот // Депонировано ВИНИТИ 23.03.2004. № 470-В2004.
17. *Karasev V.A.*, *Luchinin V.V.*, *Stefanov V.E.* Symmetry and spatial structure of the canonical set of amino acids // Fourth International Conference on Bioinformatics of Genome Regulation and Structure. BGRS'2004, Novosibirsk, Russia, July 25–30, 2004. — Novosibirsk: IC & D. 2004. V. 1. P. 278–281.
18. *Karasev V.A.*, *Luchinin V.V.*, *Stefanov V.E.* A dodecahedron-based model of spatial representation of the canonical set of amino acids // Ser. Math. Biol. and Med. V. 8. Proc. Intern. Conf. «Advances in Bioinformatics and its Applications». Eds.: M. He, G. Narasimhan, S. Petoukhov. 2005. P. 482–493. — World Scientific Publishing Co. Ltd. New Jersey et al.
19. *Карасев В.А.* Аминокислоты канонического набора как неприводимые представления группы векторов — диаметров додекаэдра // Депонировано ВИНИТИ 25.04.2007. № 461-В2007.
20. *Karasev V.A.*, *Luchinin V.V.*, *Stefanov V.E.* A model of the «molecular vector machine» for protein folding. — Proceedings of the 3-rd Moscow conference on computational molecular biology. Moscow, Russia, July 27–31, 2007. P. 134–136.

21. *Шульц Г.*, *Ширмер Р.* Принципы структурной организации белков. Пер. с англ. — М.: Мир, 1982. — 354 с.
22. *Петрашень М.И.*, *Трифонов Е.Д.* Применение теории групп в квантовой механике. — М.: Наука, 1967. — 308 с.
23. *Ичас М.* Биологический код. — М.: Мир, 1971. — 351 с.
24. *Pelc S.R.* Correlation between coding-triplets and amino-acids // Nature. 1965. V. 207. P. 597–599.
25. *Ратнер В.А.* Структура и эволюция генетического кода // Итоги науки и техники. Сер. Мол. биол. Т. 21. — М: ВИНИТИ, 1985. С. 158–197.
26. *Волькенштейн М.В.* Физика ферментов. — М.: Наука, 1967. — 200 с.
27. *Swanson R.* A unifying concept for the amino acid code // Bull. Math. Biol. 1984. V. 46. P. 187–204.
28. *Shcherbak V.I.* Rumer's rule and transformation in the context of the co-operative symmetry of the genetic code // J. Theor. Biol. 1989. V. 139. P. 271–276.
29. *Румер Ю.Б.* О систематизация кодонов в генетическом коде // ДАН СССР. 1967. Т. 167. С. 1393–1394.
30. *Румер Ю.Б.* Систематизация кодонов в генетическом коде // ДАН СССР. 1968. Т. 183. С. 225–226.
31. *Walker G.W.R.* Genetics and the origin of the genetic code // Orig. Life. 1974. V. 5. P. 351–356.
32. *Dankwerts H.J.*, *Neubert D.* Symmetryes of the genetic code-doublets // J. Mol. Evol. 1975. V. 5. P. 327–332.
33. *Карасев В.А.* Ромбический вариант генетического словаря на основе комплементарности кодирующих нуклеотидов // Вестник Ленингр. ун-та. 1976. № 3. Сер. Биол. Вып. 1. С. 93–97.
34. *Карасев В.А.*, *Сорокин С.Г.* О топологической структуре генетического кода // Генетика. 1997. Т. 33. С. 744–751.
35. *Hasegava M.*, *Miyata T.* On the antisymmetry of the amino acid code table // Orig. Life. 1980. V. 10. P. 265–270.
36. *Bertman M.O.*, *Jungck J.R.* Group graph of the genetic code // J. Heredity. 1979. V. 70. P. 379–384.
37. *Jimenez-Montaño M.A.*, *de la Mora-Basañez C.R.*, *Poschel Th.* Thehypercube structure of the genetic code explains conservative and non-conservative aminoacid substitutions in vivo and in vitro // BioSystems. 1996. V. 39. P. 117–125.
38. *Bourbaki N.* Elements de Mathematique. 3-d Ed. Livre III. Topologie generale. — Paris: Hermann, 1961.
39. *Волохонский А.Г.* О формальной структуре генетического кода // Цитология и генетика. 1972. № 6. С. 487–492.
40. *Trainor L.E.H.*, *Rowe G.W.*, *Szabo V.L.* A tetrahedral representation of polycodon sequenses and a possible origin of codon degeneracy // J. Theor. Biol. 1984. V. 104. P. 459–468.
41. *Jimenez-Montaño M.A.*, *de la Mora-Basañez R.* // In: Proc. Soc. for Math. Biol. Annual Meeting, University of California at Berkeley, July 23^{rd}–26^{th}, 1992.
42. *Klump H.H.* The physical basis of the genetic code: the choice between speed and precision // Arch. Biochem. Biophys. 1993. V. 301. P. 207–209.
43. *Петухов С.В.* Матричная генетика, алгебры генетического кода, помехоустойчивость. — М.–Ижевск: НИЦ «Регулярная и хаотическая динамика», 2008. — 316 с.
44. *Rechenberg I.* Evolutionsstrategie, Optimierung technishe Systeme nach Prinzipien der biologishe Evolution. — Stuttgart: Frommann–Holzboog, 1973.

45. *Campbell P.N.*, *Smith A.D.* Biochemistry Illustrated // Edinburgh–London–Madrid–Tokio: Curchill Livingstone, 1994. P. 8–9.
46. *Siemion I.Z.*, *Cebrat M.*, *Kluczyk A.* The problem of amino acid complementarity and antisense peptides // Curr. Protein Pept. Sci. 2004. V. 5. P. 507–527.
47. *Меклер Л.Б.*, *Идлис Л.Б.* Общий стереохимический генетический код — на пути к биологии и универсальной медицине 21 века // Природа. 1993. № 5. С. 29–63.
48. *Biro J.C.*, *Benyo B.*, *Sansom C.*, *Szlavecz A.*, *Fordos G.*, *Micsik T.*, *Benyo Z.* A common periodic table of codons and amino acids // Biochem. Biophys. Res / Commun. 2003. V. 306. P. 408–415.
49. *Balakrishnan J.* Symmetry scheme for amino acid codons // Phys. Rev. E Stat. Nonlin. Soft. Matter. Phys. 2002. V. 65(2 Pt 1), 021912.
50. *Taylor W.R.* The classification of amino acid conservation // J. Theor. Biol. 1986. V. 119. P. 205–218.
51. *Esteve J.G.*, *Falceto F.* Classification of amino acids induced by their associated matrices // Biophys. Chem. 2005. V. 115. P. 177–180.
52. *Kosiol C.*, *Goldman N.*, *Buttimore N.H.* A new criterion and method for amino acid classification // J. Theor. Biol. 2004. V. 228. P. 97–106.
53. *Карасев В.А.*, *Стефанов В.Е.*, *Курганов Б.И.* Надмолекулярные биоструктуры: организация, функционирование, происхождение // В кн.: Итоги науки и техники, сер. Биол. химия. Т. 31. — М.: ВИНИТИ, 1989. — 199 с.
54. *Karasev V.A.*, *Luchinin V.V.*, *Stefanov V.E.* A model of molecular electronics based on the concept of conjugated ionic-hydrogen bond systems // Adv. Mater. Opt. Electron. 1994. V. 4. P. 203–218.

Глава 9

МОДЕЛЬ ТОПОЛОГИЧЕСКОГО КОДИРОВАНИЯ ЦЕПНЫХ ПОЛИМЕРОВ И СТРУКТУРА БЕЛКОВ

Модель топологического кодирования цепных полимеров дает рациональное объяснение многим свойствам биологического кода, а ее развитие, приведшее молекулярной векторной машине, проливает свет на природу канонического набора аминокислот [1–3]. Наличие большого количества данных по структуре белков позволяет, с одной стороны, рассмотреть их с позиции нашей модели, а с другой стороны, использовать эти данные для экспериментальной поддержки основных положений нашей модели. Именно этим вопросам и будет посвящена настоящая глава нашей книги.

9.1. Декодирование триплетных последовательностей белков с помощью алгоритма кодирования–декодирования

9.1.1. Пример декодирования фрагмента цепного полимера. В том разделе использованы результаты разработанного в работах [1, 4] алгоритма кодирования цепных полимеров, примененного к биоструктурам. Предположим, что имеется цепь физических операторов и кодирующая ее цепь триплетов, заданных схемой 9.1:

0		1		2		3		4		5		n
Ini	–	Abc	–	Bcd	–	Cde	–	Def	–	Efg	–...–	Pqr
$X_0Y_0Z_0$		$X_1Y_1Z_1$		$X_2Y_2Z_2$		$X_3Y_3Z_3$		$X_4Y_4Z_4$	...	$X_5Y_5Z_5$	...	$X_nY_nZ_n$

(9.1)

На 0-й стадии записываем название 0-го оператора (Ini — инициирующий), кодирующий его триплет ($X_0Y_0Z_0$), а также соответствующую матрицу (см. рис. 8.8), с первым нижним индексом 0, используя при этом правила преобразования букв алфавита в бинарные значения (схема 8.4) и учитывая положения этих значений в матрице и триплете (схема 8.3). Это соответствует схеме 9.2:

№	PO	Triplet	–2	–3	–4
0	Ini	$X_0Y_0Z_0$	x_{01}	x_{02}	x_{03}
–1				x_{04}	x_{05}
–2					x_{06}

(9.2)

При этом переменные x_{01}, x_{02}, x_{03}, соответствующие связям 0-й вершины с –2-й, –3-й и –4-й 4-х-звенного графа, записываем в 0-й строке, переменные x_{04}, x_{05}, описывающие состояния связности $(i-1)$-й вершины с –3-й и –4-й, — в –1-й, а переменную x_{06}, характеризующую связность –2-й и –4-й вершин, — в –2-й строке.

На следующей, 1-й стадии, вписываем в 1-ю строку 1-й оператор (Abc), триплет $X_1Y_1Z_1$ и матрицу с переменными, имеющими первый нижний индекс 1 (схема 9.3):

№	PO	Triplet	−1	−2	−3	−4
1	Abc	$X_1Y_1Z_1$	x_{11}	x_{12}	x_{13}	
0	Ini	$X_0Y_0Z_0$		$x_{03}x_{14}$	$x_{02}x_{15}$	x_{03}
−1					$x_{04}x_{16}$	x_{05}
−2						x_{06}

(9.3)

Переменные x_{11}, x_{12}, x_{13} записываются в 1-ю строку, x_{14}, x_{15} идут в 0-ю строку, причем x_{14} вслед за x_{03}, x_{15} — после x_{02}, а x_{16} — в −1-ю строку, вслед за x_{04}. Аналогично проводим следующий этап со 2-м оператором связности (Bcd), записывая его во 2-ю строку, а триплет и матрицу — с нижним первым индексом 2 (схема 9.4):

№	PO	Triplet	0	−1	−2	−3	−4
2	Bcd	$X_2Y_2Z_2$	x_{21}	x_{22}	x_{23}		
1	Abc	$X_1Y_1Z_1$		$x_{11}x_{24}$	$x_{12}x_{25}$	x_{13}	
0	Ini	$X_0Y_0Z_0$			$x_{01}x_{14}x_{26}$	$x_{02}x_{15}$	x_{03}
−1						$x_{04}x_{16}$	x_{05}
−2							x_{06}

(9.4)

Начиная с этой стадии, в первом положении в строке группируются по три переменных ($x_1x_4x_6$) (см. нулевую строку), во втором — по две переменных (x_2x_5) и одна (x_3) — в третьем. Очевидно, что наибольшую значимость в декодировании имеет при этом переменная x_3, которая определяет в матрице тип оператора.

Используя схему 8.8, суммируем переменные и выписываем их в виде $\mathbf{y}_1$, $\mathbf{y}_2$, $\mathbf{y}_3$, с первыми нижними индексами (см. рис. 8.8), соответствующими строкам квазидиагональной теоретической матрицы (Q_t-матрицы), которая и является результатом декодирования структуры цепного полимера.

9.1.2. Апробация алгоритма на фрагменте белковой структуры. Предложенный алгоритм впервые был испытан на ряде белков в работе [4]. На схемах 9.5 и 9.6 приведен результат декодирования фрагмента белка рибонуклеазы А быка, с известной кодирующей ее цепью триплетов, первичной и молекулярной структурой [5, 6] и ее сравнение с Q-матрицей того же фрагмента, построенной на основе экспериментальных данных (Q_e-матрица). Расстояния, которые укладывались в пределах 1,1–1,9 длины пептидной связи, принимали равными 1 (наличие связности), а большие расстояния — равными 0 (нет связности) и соответствующим образом изображали на Q_e-матрице.

Сопоставление обеих матриц позволяет сделать вывод об их сходстве. На Q_e-матрице в интервале аминокислот 6–13 наблюдается спиральный фрагмент, описываемый матрицами из шести единиц (выделены уголками). Примерно в этой же области на Q_t-матрице также преобладают матрицы такого же типа, но их меньше. Следует также обратить внимание на большее разнообразие элементов на Q_t-матрице по сравнению с Q_e-матрицей, что наблюдалось и на других декодированных белках.

Таким образом, предложенный алгоритм, как оказалось, декодирует структуру белка не полностью. Для объяснения этих результатов был проведен анализ структуры Q_t- и Q_e-матриц белков.

9.1.2.1. ***Математические структуры, описывающие Q-матрицы.*** Анализ Q_t-матриц, описывающих закодированную конформацию белка, показал, что общее количество матриц, выделяемых на Q_t-матрицах — 64. Они образуют суперматрицу

№	АК	Трпл	18	17	16	15	14	13	12	11	10	09	08	07	06	05	04	03	02	01	00	–1	–2	–3	–4
20	Ala	GCC	**1**	**0**	**0**	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
19	Ala	GCT	.	**1**	**0**	**0**	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
18	Ser	TCC	.	.	**0**	**1**	**0**	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
17	Thr	ACT	.	.	.	**1**	**1**	**0**	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
16	Ser	AGC	.	.	.	.	**1**	**1**	**1**	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
15	Ser	TCC	.	.	.	.	.	**1**	**1**	**0**	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
14	Asp	GAC	.	.	.	.	.	.	**1**	**0**	**1**	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
13	Met	ATG	.	.	.	.	.	.	.	**1**	**1**	**0**	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
12	His	CAC	.	.	.	.	.	.	.	.	**1**	**1**	**1**	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
11	Gln	CAG	.	.	.	.	.	.	.	.	.	**1**	**0**	**1**	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
10	Arg	CGG	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	**1**	**1**	**1**	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
9	Glu	GAG	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	**1**	**1**	**1**	.	.	.	.	.	.	.	.	.
8	Phe	TTT	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	**1**	**1**	**0**	.	.	.	.	.	.	.	.
7	Lys	AAG	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	**1**	**1**	**1**	.	.	.	.	.	.	.
6	Ala	GCC	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	**1**	**1**	**0**	.	.	.	.	.	.
5	Ala	GCA	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	**1**	**0**	**0**	.	.	.	.	.
4	Ala	GCA	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	**1**	**1**	**0**	.	.	.	.
3	Thr	ACT	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	**1**	**1**	**0**	.	.	.
2	Glu	GAA	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	**1**	**0**	**1**	.	.
1	Lys	AAG	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	**1**	**1**	**1**	.
0	Met	ATG	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	**1**	**1**	**0**
																								1	**1**
																									0

(9.5)

состояний связности (рис. 8.3), а ее пространственным представлением является булев гиперкуб B^6 (рис. 8.4). Свойства симметрии этого гиперкуба были рассмотрены в разделе 8.2.1.5. В то же время, на Q_e-матрицах белков число вариантов матриц оказалось значительно меньше — всего 8. В структуре гиперкуба B^6 они образуют подпространство связных конформаций трехмерного куба B^3 (см. рис. 9.1. (вклейка), нижний малый куб). В Q_t-матрицах также преобладают матрицы, описываемые

№	АК	Трпл	18	17	16	15	14	13	12	11	10	09	08	07	06	05	04	03	02	01
20	Ala	GCC	**1**	**1**	**0**	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
19	Ala	GCT	.	**1**	**0**	**0**	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
18	Ser	TCC	.	.	**1**	**1**	**0**	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
17	Thr	ACT	.	.	.	**1**	**1**	**0**	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
16	Ser	AGC	.	.	.	.	**1**	**0**	**0**	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
15	Ser	TCC	.	.	.	.	.	**1**	**0**	**0**	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
14	Asp	GAC	.	.	.	.	.	.	**1**	**0**	**0**	.	.	.	.	.	.	.	.	.
13	Met	ATG	.	.	.	.	.	.	.	**1**	**1**	**1**	.	.	.	.	.	.	.	.
12	His	CAC	.	.	.	.	.	.	.	.	**1**	**1**	**1**	.	.	.	.	.	.	.
11	Gln	CAG	.	.	.	.	.	.	.	.	.	**1**	**1**	**1**	.	.	.	.	.	.
10	Arg	CGG	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	**1**	**1**	**1**	.	.	.	.	.
9	Glu	GAG	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	**1**	**1**	**1**	.	.	.	.
8	Phe	TTT	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	**1**	**1**	**1**	.	.	.
7	Lys	AAG	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	**1**	**1**	**1**	.	.
6	Ala	GCC	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	**1**	**1**	**1**	.
5	Ala	GCA	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	**1**	**0**	**0**
4	Ala	GCA	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	**1**	**0**
3	Thr	ACT	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	**1**
2	Glu	GAA	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
1	Lys	AAG	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.

(9.6)

трехмерным кубом B^3, в то время как прочие матрицы встречаются редко (минорные). Отметим, что в гиперкубе можно выделить также подпространство антисвязных конформаций (верхний малый куб), которое в данной книге не рассматривается.

9.1.2.2. ***Анализ элементов трехмерного куба B^3.*** Для удобства анализа нижний малый куб, а также описываемые им переходы конформаций 4-х-звенного графа представлены на рисунках 9.2, *а* и 9.2, *б*. Как видно из рис. 9.2, *а*, в структуру куба B^3 входят четыре матрицы:

$$\begin{matrix}1&0&0\\&1&0\\&&1\end{matrix}, \quad \begin{matrix}1&0&1\\&1&0\\&&1\end{matrix}, \quad \begin{matrix}1&1&0\\&1&1\\&&1\end{matrix}, \quad \begin{matrix}1&1&1\\&1&1\\&&1\end{matrix},$$

у которых первая пара переменных симметрична третье паре. Эти матрицы описывают симметричные конформации 4-х-звенного графа, что видно из сопоставления с рис. 9.2, *б*. Обозначим их, соответственно, как T_1, T_2, T_3, T_4. Они образуют две пары: $T_1 \leftrightarrow T_2$ и $T_3 \leftrightarrow T_4$, каждая из которых связана внутри куба однобитовым

переходом. На Q_t-матрице эти полуматрицы могут находиться между собой одновременно как в отношениях симметрии, так и в отношениях трансляционного сдвига.

Четыре матрицы куба

$$\begin{matrix} 1 & 1 & 0 \\ & 1 & 0 \\ & & 1 \end{matrix}, \quad \begin{matrix} 1 & 0 & 0 \\ & 1 & 1 \\ & & 1 \end{matrix}, \quad \begin{matrix} 1 & 1 & 1 \\ & 1 & 0 \\ & & 1 \end{matrix}, \quad \begin{matrix} 1 & 0 & 1 \\ & 1 & 1 \\ & & 1 \end{matrix}$$

располагаются симметрично от центра и описывают асимметричные конформации

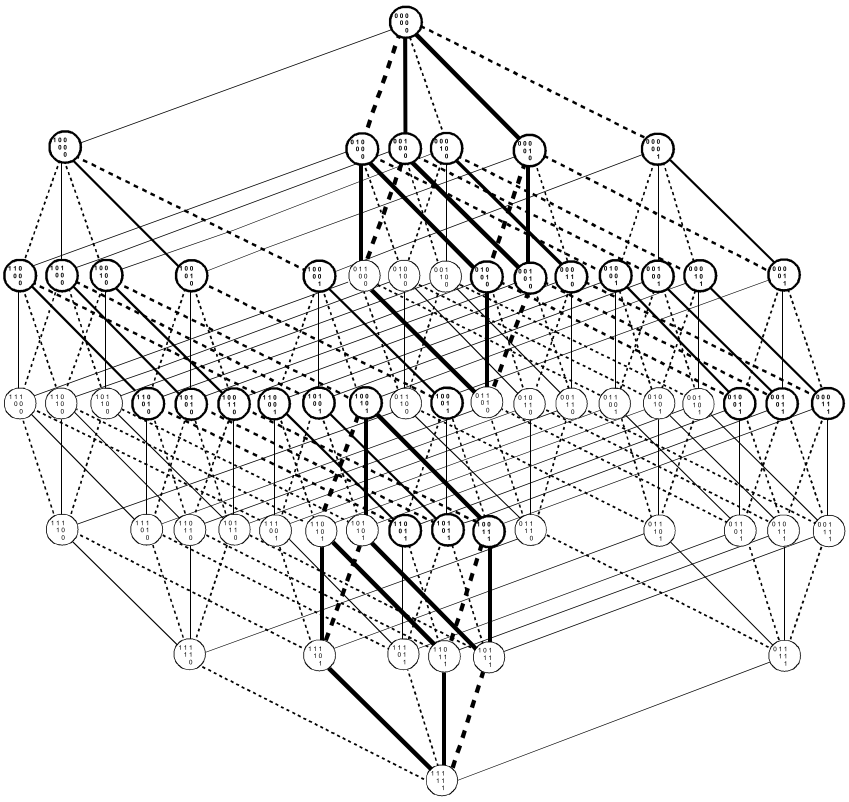


Рис. 9.1. Подпространства связных (внизу) и антисвязных (вверху) конформаций в виде трехмерных кубов B^3 в структуре булева в гипрекуба B^6

(рис. 9.2, *б*). Мы обозначили первую пару матриц как ${}_1S$ и S_1, а вторую пару — как ${}_2S$ и S_2. На Q_t-матрице они могут находиться либо в отношениях симметрии, либо трансляционного сдвига. Каждая из матриц, составляющих S-пару, как видно из рис. 9.2, *а*, может переходить путем однобитовых переходов в симметричную матрицу

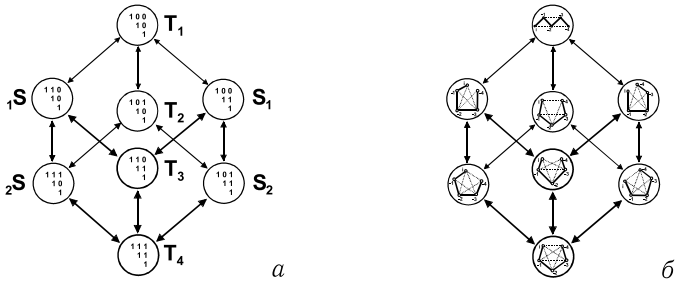


Рис. 9.2. Семейство матриц, описывающих полностью связные конформации Q-фрагментов (*а*) и сами описываемые Q-фрагменты (*б*)

(схема 9.7):

$$\begin{aligned} {}_1\mathrm{S} &\leftrightarrow \mathrm{T}_1 \leftrightarrow \mathrm{S}_1, \\ {}_1\mathrm{S} &\leftrightarrow \mathrm{T}_3 \leftrightarrow \mathrm{S}_1, \\ {}_2\mathrm{S} &\leftrightarrow \mathrm{T}_2 \leftrightarrow \mathrm{S}_2, \\ {}_2\mathrm{S} &\leftrightarrow \mathrm{T}_4 \leftrightarrow \mathrm{S}_2 \end{aligned} \tag{9.7}$$

Кроме того, S-матрицы могут попарно переходить друг в друга (схема 9.8):

$$\begin{aligned} {}_1\mathrm{S} &\leftrightarrow {}_2\mathrm{S} \\ \mathrm{S}_1 &\leftrightarrow \mathrm{S}_2 \end{aligned} \tag{9.8}$$

с сохранением асимметрии. В этом суть преобразований матриц — элементов куба B^3. Отметим, что при двумерном представлении каждый тип симметрии можно обозначить «своим цветом», что было использовано нами при разработке программы Protein_2002.

Как и матрицы, все 4-х-звенные графы, имеющие связные конформации (рис. 9.2, *б*), соединены в пары, связанные однобитовыми изменениями в структуре (разрыв или образование одного ребра связности). Самая верхняя конформация, описываемая матрицей T_1, обладает двумя степенями свободы — изменения конформации графа могут осуществляться вокруг второго (связь вершин $i+1$–$i+2$) и третьего (связь вершин $i+2$–$i+3$) звеньев графа. Конформации, описываемые матрицами ${}_1\mathrm{S}$ и S_1, имеют по одной степени свободы — изменения конформации возможны относительно третьего и второго звеньев, соответственно, для левого и правого графов. Остальные конформации (T_2, ${}_2\mathrm{S}$, S_2, T_3, T_4) не обладают степенями свободы, т. е. они являются жестко фиксированными. Однако, при однобитовых изменениях большая их часть, кроме T_4, способна переходить в конформации, обладающие подвижностью.

9.1.2.3. ***Построение матриц симметрии.*** Выше мы декодировали фрагмент белка рибонуклеазы, который сопоставили с данными эксперимента. Используя проведенный выше анализ, можно на Q_t- и Q_e-матрицах построить матрицы симметрии элементов. Для большей компактности, обозначим матрицы, связанные симметрия-

ми, следующим образом (схема 9.9):

T_1	T_2	T_3	T_4	S_1	S_2
T	$\underline{T}$	R	$\underline{R}$	S	$\underline{S}$

(9.9)

Области, лишенные симметрии (центры асимметрии), обозначены буквой A. На схемах 9.10 и 9.11 приведены построенные с использованием этих обозначений матрицы симметрии.

Как видно на схеме 9.10, на Q_t-матрице выделяется два блока, отграниченные асимметричными матрицами: с 7-й по 14-ю аминокислоты и область с 16-й по 17-ю аминокислоты. Кроме того, на участке с 18-й по 20-ю аминокислоты выделяется большой центр асимметрии. Сопоставление с Q_e-матрицей (схема 9.11) показывает, что на ней выделяются спиральный блок с 7-й по 13-ю аминокислоты, небольшой участок (15-я, 16-я аминокислоты) β-структуры и изгиб в области с 18-й по 20-ю аминокислоты. Таким образом, имеется сходство в распределении блоков на Q_t- и Q_e-матрицах. Различие, однако, состоит в том, что выделенные декодированные блоки обладают меньшей симметрией, чем построенные на основе экспериментальных данных.

Если на Q_t-матрице путем однобитовых переходов преобразовать матрицы, связанные симметрией R в положениях 8 и 13 в элементы, обладающие симметрией $\underline{R}$ и такое же преобразование осуществить с элементами, связанными симметрией $\underline{S}$ в положениях $11 \leftrightarrow 12$ и $12 \leftrightarrow 14$, то мы получим, как и на Q_e-матрице, спиральный блок.

В качестве еще одного примера на рис. 9.3 приведена матрица декодирования глобулярного белка утероглобина кролика. Это сравнительно небольшой α-спиральный белок (70 аминокислот) с известным геном и структурой [7, 8]. Сопоставление Q_t-матрицы с Q_e-матрицей показывает, что расположение блоков, выделенных центрами асимметрии (тонкие линии), принципиально совпадает. При этом, как видно из рисунка, степень симметрии на Q_e-матрице выше, чем на Q_t-матрице.

В работе [4] был приведен ряд других примеров, из которых также следовал общий вывод: симметрия в блоках Q-матриц декодированных цепей триплетов ниже, чем симметрия в блоках функциональных белков. При этом границами блоков служили минорные асимметричные матрицы.

Более детальный анализ декодированных последовательностей (данные не публиковались) показал, что картина распределения блоков в теории и эксперименте зачастую не так идеальна, так это следует из приведенных примеров. Такая «неполнота» декодирования долгое время казалась нам непонятной. Лишь в недавнее время, после того, как была разработана модель молекулярной векторной машины (МВМ) [2, 3] стала ясна причина этого. Дело в том, что предложенный в работах [1, 4] алгоритм использует только информацию, закодированную триплетами. В то же время, как показано в работах [2, 3], боковые цепи аминокислот, воссоздающие закодированную конформацию, связаны со структурой тетраэдрического C_i^α-атома, сопряженное вращение которого определяет направление на C_{i+1}^α-атом, а следовательно, и конформацию растущей цепи, которая описывается переменными 001, 010, 001 и 000. Учет этих переменных в алгоритме, как мы полагаем, и будет обеспечивать полное декодирование белковой структуры. Работы в этом направлении ведутся.

№	АК	Трпл	18	17	16	15	14	13	12	11	10	09	08	07	06	05	04	03	02	01	00	–1	–2	–3	–4
20	Ala	GCC	**1**	**0**	**0**	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
19	Ala	GCT	**.**	**1**	**0**	**0**	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
18	Ser	TCC	**.**	**.**	**0**	**1**	**0**	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
17	Thr	ACT	**.**	**.**	**.**	**1**	**1**	**0**	**.**	A	**.**	R	**.**	**.**	**.**	**.**	R	**.**	A	**.**	**.**	**.**	**.**	**.**	A
16	Ser	AGC	**.**	**.**	**.**	**.**	**1**	**1**	**1**	A	**.**	**.**	**.**	**.**	R	R	.	R	A	**.**	**.**	**.**	**.**	R	**.**
15	Ser	TCC	**.**	**.**	**.**	**.**	**.**	**1**	**1**	**0**	A	A	A	A	A	A	A	A	A	S	**.**	**.**	**.**	**.**	A
14	Asp	GAC	**.**	**.**	**.**	**.**	**.**	**.**	**1**	**0**	**1**	**.**	S	**.**	**.**	**.**	**.**	**.**	A	**.**	**.**	**.**	**.**	**.**	A
13	Met	ATG	**.**	**.**	**.**	**.**	**.**	**.**	**.**	**1**	**1**	**0**	**.**	**.**	**.**	**.**	R	**.**	A	**.**	R	**.**	**.**	**.**	A
12	His	CAC	**.**	**.**	**.**	**.**	**.**	**.**	**.**	**.**	**1**	**1**	**1**	S	**.**	**.**	**.**	**.**	A	**.**	**.**	**.**	S	**.**	A
11	Gln	CAG	**.**	**.**	**.**	**.**	**.**	**.**	**.**	**.**	**.**	**1**	**0**	**1**	**.**	**.**	**.**	**.**	A	**.**	**.**	**.**	**.**	**.**	A
10	Arg	CGG	**.**	**.**	**.**	**.**	**.**	**.**	**.**	**.**	**.**	**.**	**1**	**1**	**1**	R	**.**	R	A	**.**	**.**	**.**	**.**	R	A
9	Glu	GAG	**.**	**.**	**.**	**.**	**.**	**.**	**.**	**.**	**.**	**.**	**.**	**1**	**1**	**1**	**.**	R	A	**.**	**.**	**.**	**.**	R	A
8	Phe	TTT	**.**	**.**	**.**	**.**	**.**	**.**	**.**	**.**	**.**	**.**	**.**	**.**	**1**	**1**	**0**	**.**	A	**.**	R	**.**	**.**	**.**	A
7	Lys	AAG	**.**	**.**	**.**	**.**	**.**	**.**	**.**	**.**	**.**	**.**	**.**	**.**	**.**	**1**	**1**	**1**	A	**.**	**.**	**.**	**.**	R	A
6	Ala	GCC	**.**	**.**	**.**	**.**	**.**	**.**	**.**	**.**	**.**	**.**	**.**	**.**	**.**	**.**	**1**	**1**	**0**	S	**.**	**.**	**.**	**.**	A
5	Ala	GCA	**.**	**.**	**.**	**.**	**.**	**.**	**.**	**.**	**.**	**.**	**.**	**.**	**.**	**.**	**.**	**1**	**0**	**0**	**.**	S	**.**	**.**	A
4	Ala	GCA	**.**	**.**	**.**	**.**	**.**	**.**	**.**	**.**	**.**	**.**	**.**	**.**	**.**	**.**	**.**	**.**	**1**	**1**	**0**	A	A	A	A
3	Thr	ACT	**.**	**.**	**.**	**.**	**.**	**.**	**.**	**.**	**.**	**.**	**.**	**.**	**.**	**.**	**.**	**.**	**.**	**1**	**1**	**0**	A	A	A
2	Glu	GAA	**.**	**.**	**.**	**.**	**.**	**.**	**.**	**.**	**.**	**.**	**.**	**.**	**.**	**.**	**.**	**.**	**.**	**.**	**1**	**0**	**1**	A	A
1	Lys	AAG	**.**	**.**	**.**	**.**	**.**	**.**	**.**	**.**	**.**	**.**	**.**	**.**	**.**	**.**	**.**	**.**	**.**	**.**	**.**	**1**	**1**	**1**	A
0	Met	ATG	**.**	**.**	**.**	**.**	**.**	**.**	**.**	**.**	**.**	**.**	**.**	**.**	**.**	**.**	**.**	**.**	**.**	**.**	**.**	**.**	**1**	**1**	**0**
																								1	**1**
																									0

(9.10)

9.2. Анализ 4-х-звенных двойных циклов в белках с позиции молекулярной векторной машины

Как следует из результатов, полученных в работах [1–4] (см. гл. 8), в основу построения нашей модели топологического кодирования был положен анализ свойств 4-х-звенного фрагмента цепного полимера. В применении к белкам это фрагмент, состоящий из 5-ти аминокислот. Наибольший интерес представляют такие фрагменты, в которых боковые цепи образуют водородную связь с O_{i-4}-атомом 4-х-звенного цикла, которые можно назвать двойными циклами. Первый цикл в них образован за счет 4-х-звенного фрагмента основной цепи, с водородной связью $N_iH\ldots O_{i-4}{=}C$. Назовем его основным циклом. Второй цикл формирует боковая цепь, образующая водородную связь $R_i\ldots O_{i-4}{=}C$ с основной цепью. Интерес к двойным циклам обу-

№	АК	Трпл	18	17	16	15	14	13	12	11	10	09	08	07	06	05	04	03	02	01
20	Ala	GCC	**1**	**1**	**0**	S	A	.	.	.	S	.	.	.	.	.	.	.	A	.
19	Ala	GCT	.	**1**	**0**	**0**	A	S	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A .	
18	Ser	TCC	.	.	**1**	**1**	**0**	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
17	Thr	ACT	.	.	.	**1**	**1**	**0**	.	.	S	.	.	.	.	.	.	.	A	.
16	Ser	AGC	.	.	.	.	**1**	**0**	**0**	T	.	.	.	.	.	.	.	.	A	T
15	Ser	TCC	.	.	.	.	.	**1**	**0**	**0**	.	.	.	.	.	.	.	.	A	T
14	Asp	GAC	.	.	.	.	.	.	**1**	**0**	**0**	A	A	A	A	A	A	A	A	.
13	Met	ATG	.	.	.	.	.	.	.	**1**	**1**	**1**	R	R	R	R	R	R	A .	
12	His	CAC	.	.	.	.	.	.	.	.	**1**	**1**	**1**	R	R	R	R	R	A	.
11	Gln	CAG	.	.	.	.	.	.	.	.	.	**1**	**1**	**1**	R	R	R	R	A	.
10	Arg	CGG	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	**1**	**1**	**1**	R	R	R	A	.
9	Glu	GAG	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	**1**	**1**	**1**	R	R	A	.
8	Phe	TTT	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	**1**	**1**	**1**	R	A	.
7	Lys	AAG	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	**1**	**1**	**1**	A	.
6	Ala	GCC	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	**1**	**1**	**1**	.
5	Ala	GCA	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	**1**	**0**	**0**
4	Ala	GCA	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	**1**	**0**
3	Thr	ACT	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	**1**
2	Glu	GAA	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
1	Lys	AAG	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.

(9.11)

словлен тем, что боковые цепи рассматриваются нами как неприводимые представления векторов, действующих на O_{i-4}-атом (гл. 8, разделы 8.5 и 8.7). Анализ свойств таких фрагментов с позиции молекулярной векторной машины (МВМ) позволит по-новому рассмотреть полученные данные и, в какой-то мере, уточнить реальную структуру МВМ.

9.2.1. Частота встречаемости двойных 4-х-звенных циклов. Нами было проведено два анализа таких циклов, первый из которых включал более 1200 циклов, найденных с помощью программы Protein 3D примерно в 150 белковых структурах, исследованных методом РСА, а второй — почти 4000 циклов в 350 белках. В каждой выборке найденные циклы были разбиты на две группы (табл. 9.1), в соответствии с их положением в МВМ (рис. 8.33) и классификацией аминокислот на додекаэдре (рис. 8.32): столбцы справа соответствуют более коротким боковым цепям, расположенным в МВМ и классификации справа. Слева находятся аналогичные по свойствам, но более массивные боковые цепи. При этом последовательность боковых цепей идет сверху вниз, аналогично рис. 8.32 и 8.33, что сопровождается увеличением размеров боковых цепей.

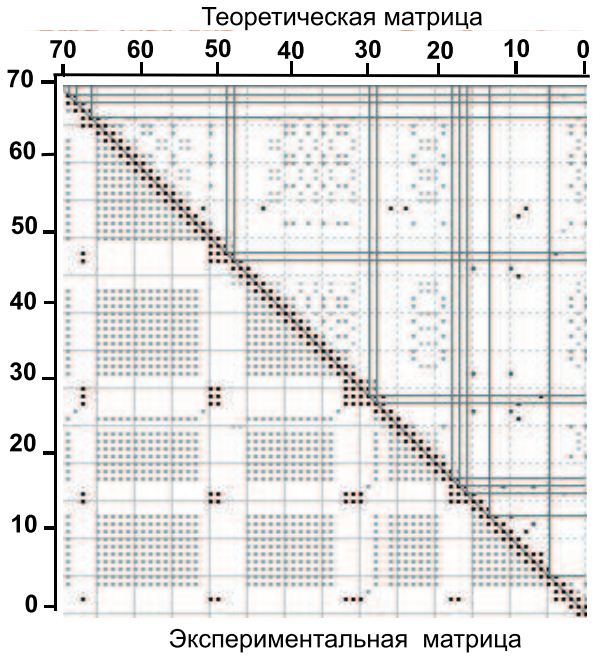


Рис. 9.3. Матрица декодирования белка утероглобина кролика

Из приведенной таблицы следует, что результаты первого и второго анализа, несмотря на различие выборки, принципиально совпадают. В таблице видно, что все 12 боковых цепей, образующих водородные связи с основной цепью, формируют двойные 4-х-звенные циклы. Наиболее распространенными боковыми цепями, участвующими в них, являются Thr (21,4 и 23,0 %), Ser (20,0 и 20,2 %), причем количество Thr несколько больше, чем Ser. Циклы, образуемые боковой цепью Cys, встречаются в 4–5 раз реже, чем Thr и Ser (5,6 и 3,9 %). Было также обнаружено, что боковая цепь Tyr образует водородную связь с основной цепью, но связь $N_iH\ldots O_{i-4}{=}C$ в цикле отсутствует. Количество циклов с Tyr для первой выборки составило 0,2 %, а для второй — 0,4 %.

Для других пар аминокислот, однако, имеются существенные различия внутри пар. Циклы, образованные аминокислотами, расположенными на додекаэдре справа, т. е. меньшего размера, являются более распространенными, чем расположенными слева, что наблюдается в обеих выборках. Для примера, сравним частоту их встречаемости (в процентах) для второй выборки: Glu (6,0 %)

и Asp (**15,6** %), Gln (3,8 %) и Asn (**15,9),** Lys (1,4) и Arg (**5,8**), Trp (0,4) и His (**3,8**). Количество более легких двойных циклов превышает число более тяжелых в 2,5–4 раза, а для пары Trp–His — почти в десять раз. Можно отметить также, что распространение боковых цепей верхней части додекаэдра примерно в 3–4 раза выше, чем нижней. Можно предположить, что эти различия связаны с тем, что боковые цепи правой стороны МВМ в большей степени задают направление цепи, способствующее образованию α-спиралей белковой цепи.

Таблица 9.1

Частоты встречаемости аминокислот, образующих водородные связи боковой цепи с основной цепью

Выборка 1, $N = 1264$							Выборка 2, $N = 4112$					
	n	%		n	%		n	%		n	%
Thr	270	**21,4**	Ser	252	**20,0**	Thr	943	**22,9**	Ser	827	**20,1**
			Cys	71	5,6				Cys	160	3,9
Glu	64	5,1	Asp	221	**17,5**	Glu	245	6,0	Asp	640	**15,6**
Gln	60	4,8	Asn	168	**13,3**	Gln	157	3,8	Asn	653	**15,9**
Lys	27	2,1	Arg	86	**6,8**	Lys	59	1,4	Arg	237	**5,8**
Trp	7	0,5	His	34	**2,7**	Trp	16	0,4	His	157	**3,8**
Tyr	3	0,2				Tyr	18	0,4			

9.2.2. Распределение аминокислот внутри основных циклов. В основном цикле имеется четыре положения: $(i-1)$-е, $(i-2)$-е, $(i-3)$-е, $(i-4)$-е, в которых могут находиться различные аминокислоты. Наиболее важными, как оказалось, являются положения $(i-1)$-е, присутствие в котором определенных аминокислот окончательно определяет, замкнется ли данный фрагмент в двойной цикл и $(i-4)$-е, связанное с формирование структурно-функциональных узлов ближнего порядка (см. далее). Тем не менее, мы проанализировали все положения, а результаты привели в таблицах 9.2. - 9.6. В этих таблицах по вертикали, в столбцах, расположены проанализированные циклы (их всего 12), разбитые, как и в табл. 9.1, на две группы (справа — более легкие боковые цепи правой стороны MBM и классификации аминокислот), а по горизонтали — содержание той или иной аминокислоты в цикле в соответствующем положении. Частоты встречаемости аминокислот в циклах в обоих анализах принципиально совпали. Мы приводим результаты второго из них, как имеющего большую выборку.

9.2.2.1. ***Аминокислоты, занимающие в основном цикле $(i-1)$-е положение.*** В табл. 9.2 представлены частоты встречаемости аминокислот, находящихся в $(i-1)$-м положении. При этом порядок столбцов аминокислот слева направо сохраняется таким же, как в табл. 9.1. В то же время, расположение аминокислот сверху вниз несколько изменено. Сначала идут боковые цепи, лежащие в MBM в пределах плоскости I. Затем идут более легкие боковые цепи, расположенные в MBM справа от плоскости I, а далее — более тяжелые, занимающие левую от плоскости I сторону. Следует отметить, что в целях повышения статистической достоверности для редко встречающихся циклов (Lys, Tyr, Trp, His) было проанализировано дополнительное количество белков, которые не вошли в общую статистическую выборку.

Из таблицы видно, что группа боковых цепей, расположенных в плоскости I, занимает в этих циклах особое положение. Во первых, для большинства циклов в $(i-1)$-м положении отсутствует Pro. Исключение составляют циклы с Ser и Thr, а также Glu и Gln (боковые цепи правой стороны MBM), в которых, хотя и редко, Pro в этом положении обнаруживается (доли процента). По нашим наблюдениям, такие циклы, как правило, расположены в начальных участках спиралей. Это наблюдение

позволяет сделать практический вывод для целей конструирования фрагментов спиралей, содержащих двойные циклы. Эти циклы не должны содержать Pro, поскольку Pro является оператором антисвязности (обратным элементом — см. раздел 8.7.2.3) и препятствует формированию циклов.

Таблица 9.2

Частоты встречаемости наиболее распространенных аминокислот, расположенных внутри основных циклов в $i-1$-м положении (%)

AA	Thr	Glu	Gln	Lys	Trp	Tyr		Ser	Cys	Asp	Asn	Arg	His
N	943	245	157	59	25	18		827	160	640	653	243	157
Gly	3,1	3,7	1,9	3,4	0	5,5		2,7	4,4	3,1	2,8	3,7	3,2
Pro	0,2	0,4	0,6	0	0	0		0,4	0	0	0	0	0
Ala	**9,9**	**12,2**	**10,8**	**13,6**	**4,0**	0		**12,8**	**15,0**	**11,3**	**11,0**	**18,1**	**11,5**
Leu	**13,0**	**13,5**	**16,6**	**18,6**	**4,0**	**5,5**		**15,2**	**13,7**	**13,0**	**11,3**	**15,6**	**8,3**
Ser	4,4	3,7	5,7	1,7	**4,0**	5,5		4,6	3,8	4,8	3,5	2,5	5,7
Cys	1,1	1,2	2,5	**0**	**0**	0		1,0	**0**	1,0	1,4	1,0	3,8
Asp	5,6	1,6	3,2	3,4	**16.0**	**11,1**		4,2	6,9	2,7	3,8	3,3	6,4
Asn	4,8	2,9	3,8	3,4	**0**	5,5		4,5	2,5	4,4	3,4	2,5	5,1
Val	**8,1**	**5,3**	**7,6**	**0**	**12,0**	**16,6**		**6,2**	**5,6**	**7,8**	**7,0**	**5.3**	3,8
Arg	5,7	**7,3**	**9,5**	**13,6**	4,0	5,5		5,7	5,0	**8,0**	**6,9**	6,2	6,4
His	2,2	2,9	1,9	1,7	**8,0**	0		2,2	1,9	2,3	2,0	2,1	1,3
Phe	4,6	6,9	3,2	**0**	**4,0**	0		3,9	3,8	5,6	5,4	2,1	1,9
Thr	5,0	4,1	5,1	5,1	**0**	5,5		5,0	4,4	3,9	3,8	4,9	4,5
Met	3,3	3,3	0,6	5,1	**8,0**	0		2,4	2,5	4,2	2,8	2,9	3,8
Glu	**7,0**	**7,7**	**5,7**	**8,5**	**12,0**	**11,1**		**7,0**	**8,1**	**5,0**	**7,8**	**7,8**	**11,5**
Gln	4,4	2,4	5,7	5,1	**0**	5,5		3,9	3,8	4,8	5,4	4,9	5,7
Ile	**5,3**	**7,7**	**5,7**	**3,4**	**0**	**11,1**		**8,3**	**6,2**	**8,4**	**10,6**	**7,0**	**2,5**
Lys	**7,6**	**9,8**	**7,0**	**10,2**	**8,0**	5,5		**7,4**	**8,1**	**5,6**	**6,4**	**7,0**	**9,5**
Trp	1,2	0,8	1,3	3,4	**0**	0		1,1	1,9	0,7	1,4	0,5	1,9
Tyr	3,5	2,4	1,3	**0**	**8,0**	0		2,8	2,5	3,1	3,4	2,9	3,2

При этом Pro, вероятно, определяет такое направление на $(i-1)$-й C^{α}_i-атом, которое не приводит к формированию 4х- звенных циклов. Во-вторых, в этом положении сравнительно редко встречается Gly. Наконец, в третьих, чаще, чем другие

боковые цепи (более 10 % каждая), в $(i-1)$-м положении обнаруживаются Ala и Leu. Исключение оставляют циклы с Trp, в которых не найдено Gly.

Высокая частота встречаемости в $(i-1)$-м положении основных циклов для Ala и Leu наводит на мысль, что эти две аминокислоты, находясь в i-м положении спирали в процессе ко-трансляционного сворачивания белка, имеют вектор на i-ю аминокислоту со значением 001 (α-спиральная конформация).

Другие операторы антисвязности Val и Ile (от 6 до 10 %), встречаются в $(i-1)$-м положении в обеих группах примерно поровну, кроме циклов с Lys (не найден Val), и циклов с Trp (не обнаружен Ile). Содержание операторов связности — Glu, Arg, Lys в большинстве циклов составляет от 7 до 13 %, что также указывает на возможность их детерминировать i-й фрагмент значением 001.

Ряд интересных наблюдений можно сделать для циклов с Lys и Trp. Эти две боковые цепи воссоздают вектора, направленные в нижний левый угол MBM. В этой связи они делают крутой поворот своей цепи, что должно приводить к ограничению длины боковой цепи, занимающей $(i-1)$-е положение, иначе циклы не замкнутся. Иными словами, для образования двойных циклов с этими боковыми цепями должны проявляться правила отбора. Так, для циклов с Lys в $(i-1)$-м положении отсутствуют: Pro, Cys, Val, Phe, Tyr. Еще сильнее могут действовать правила отбора для Trp, в циклах которого мы не обнаружили Gly, Pro, Ala, из плоскости I, Cys и Asn — боковых цепей правой стороны MBM и Thr, Ile, Gln, Trp — боковых цепей левой стороны MBM. Однако эти наблюдения являются предварительными ввиду небольшой выборки циклов с Lys и Trp.

9.2.2.2. ***Анализ аминокислот, занимающих в основном цикле $(i-2)$-е положение.*** В табл. 9.3 показаны аминокислоты, занимающие $(i-2)$-е положение в циклах. Для этого положения наиболее характерным является высокая частота встречаемости (от 6 до 20 %) операторов антисвязности (Ala, Leu, Ile, Val). В то же время, содержание операторов связности, как правило, не превышает 5 %, за исключением, пожалуй, циклов с цистеином, где много Glu, Arg, Lys, а также с триптофаном, содержащим в этом положении около 32 % глютаминовой кислоты. Содержание Pro в $(i-2)$-м положении хотя и не слишком высокое (доли процента), но все же заметное для всех циклов, кроме Lys, Trp и Tyr. Обращает на себя внимание высокое содержание Gly (более 50 %) в циклах с Tyr. Не

исключено, что именно присутствие Gly в этом положении способствует замыканию в цикл тирозинов, содержащих эту аминокислоту.

9.2.2.3. ***Относительное содержание аминокислот, занимающих в основном цикле $(i-3)$-е положение.*** Данные по содержанию различных аминокислот в $(i-3)$-м положении приведены в табл. 9.4. Для этого положения характерно увеличение содержания пролина от долей процента до почти 4 % (триптофан, как имеющий малую выборку, в расчет не принимаем) и высокое содержание Ala, Leu. Для циклов, образованных боковыми цепями обеих групп, расположенных в MBM по разные стороны от плоскости I, характерно также повышенное содержание

операторов связности, в частности Asp и Glu, а также Arg и Lys. При этом наблюдается тенденция к корреляции между типом цикла и типом оператора. Например, для боковых цепей левой стороны MBM: для Glu увеличено содержание Arg, Glu, Gln, Lys; для Gln — Glu; для Lys — Asp, Arg, Glu, Gln. Та же тенденция прослеживается для боковых цепей правой стороны MBM: для Cys — Glu, для Asp —

Таблица 9.3

Частоты встречаемости аминокислот, расположенных внутри основных циклов в $i-2$-м положении (%)

AA	Thr	Glu	Gln	Lys	Trp	Tyr		Ser	Cys	Asp	Asn	Arg	His
n	943	245	157	59	25	18		827	160	640	653	243	157
Gly	3,2	2,9	1,9	**0**	8,0	**55,6**		4,1	3,1	2,2	4,1	2,5	4,5
Pro	0,7	0,4	0,6	**0**	**0**	0		0,4	0,6	0,3	0,1	0,5	0,6
Ala	**13,3**	**15,9**	**13,4**	**20,3**	8,0	**11,1**		**11,8**	**9,4**	**13,0**	**9,3**	**14,0**	**13,4**
Leu	**11,2**	**16,7**	**19,7**	**16,9**	4,0	**11,1**		**14,4**	**6,2**	**19,7**	**11,6**	**14,8**	**12,7**
Ser	5,4	2,4	1,9	1,7	4,0	0		3,3	5,6	1,7	4,1	4,1	5,1
Cys	1,6	1,6	1,3	1,7	8,0	0		1,8	1,2	1,7	1,8	0,05	1,3
Asp	3,7	2,4	5,1	3,4	4,0	**11,1**		2,9	5,6	1,9	3,1	1,6	5,1
Asn	2,6	**0**	1,3	**0**	**0**	0		2,1	3,8	1,4	2,3	1,6	2,5
Val	**5,9**	**6,9**	**8,2**	**13,6**	**0**	0		**10,4**	**5,6**	**9,7**	**9,3**	**8,2**	**6,4**
Arg	4,3	4,1	5,7	3,4	4,0	0		3,9	**10,0**	3,3	4,9	5,3	3,8
His	3,4	1,2	**0**	**0**	4,0	0		2,5	2,5	1,6	1,8	2,5	1,3
Phe	4,3	**6,5**	4,4	**10,2**	**0**	0		**5,9**	3,1	**7,5**	**7,0**	**6,6**	4,5
Thr	4,6	2,4	1,9	5,1	**0**	**11,1**		3,4	6,9	3,3	4,9	3,7	4,5
Met	3,5	2,0	3,2	1,7	4,0	0		2,5	4,4	4,2	3,4	3,3	6,4
Glu	**7,1**	**6,9**	**7,0**	1,7	**32,0**	0		**5,6**	**14,4**	3,9	**6,3**	**6,2**	**6,4**
Gln	5,2	6,1	4,4	1,7	4,0	0		3,6	4,4	2,8	2,4	3,7	5,7
Ile	**9,8**	**11,0**	**12,1**	**8,5**	4,0	0		**10,4**	2,5	**10,5**	**9,6**	**10,7**	5,1
Lys	4,4	4,5	3,2	3,4	12,0	0		4,7	**8,8**	3,8	5,5	5,3	7,0
Trp	1,7	3,3	1,3	**0**	**0**	0		2,1	0,6	2,5	2,3	1,6	1,9
Tyr	4,0	2,9	3,2	6,8	**0**	0		4,2	1,2	5,2	5,2	3,3	1,9

Asp, Glu, Lys, для Asn — Asp, Glu, для Arg — Asp, Glu, Lys. Это может быть связано с возможностью формирования водородных связей i-го оператора связности не только с O_{i-4}-атомом кислорода, но и боковыми цепями, находящимися в $(i-3)$-м положении, что требует дополнительного анализа.

9.2.2.4. ***Состав аминокислот, занимающих в основном цикле $(i-4)$-е положение.*** Анализ данных по составу аминокислот, которые находятся в $(i-4)$-м положении основного цикла (табл. 9.5.), заслуживает особого внимания. Для этих боковых цепей характерна корреляция повышенного содержания некоторых амино-

Таблица 9.4

Частоты встречаемости аминокислот, расположенных внутри 4-х-звенных циклов в $i-3$-м положении (%)

AA	Thr	Glu	Gln	Lys	Trp	Tyr		Ser	Cys	Asp	Asn	Arg	His
n	943	245	157	59	25	18		827	160	640	653	243	157
Gly	3,8	1,6	2,5	1,7	**4,0**	**11,1**		4,0	**8,1**	2,2	2,8	2,9	1,3
Pro	2,9	1,6	1,9	1,7	**12,0**	**11,1**		1,0	**3,8**	2,8	0,1	1,6	3,2
Ala	**14,4**	**10,6**	**10,2**	**6,8**	**4,0**	**5,5**		**11,1**	**11,2**	**14,8**	**15,6**	**15,2**	**17,8**
Leu	**10,1**	**8,6**	**14,6**	**6,8**	0	**5,5**		**12,2**	**11,9**	**8,1**	**10,6**	**7,0**	**13,4**
Ser	6,4	6,5	1,9	6,8	**4,0**	**5,5**		5,9	5,6	4,8	4,4	3,7	3,8
Cys	0,4	0,4	1,3	0	0	0		0,8	0,6	2,0	0,05	1,6	2,5
Asp	**6,7**	4,5	4,4	**10,2**	**8,0**	**5,5**		5,0	0,6	**7,8**	**7,8**	**8,6**	4,5
Asn	2,3	3,3	2,5	1,7	0	0		3,3	1,9	3,8	3,4	1,0	0,6
Val	**6,5**	**5,3**	**5,1**	1,7	**4,0**	0		**7,4**	**8,8**	3,0	4,9	4,9	**8,9**
Arg	4,1	**8,6**	5,7	**10,2**	0	**11,1**		4,3	5,0	3,9	5,5	6,2	4,5
His	2,3	1,2	0,6	**0**	0	0		2,2	2,5	2,5	1,1	5,1	1,9
Phe	4,4	1,6	7,6	3,4	**4,0**	0		5,9	4,4	3,9	4,1	2,5	5,1
Thr	3,8	4,1	6,4	3,4	**8,0**	**11,1**		5,6	2,5	4,2	6,4	4,9	6,4
Met	2,6	4,9	1,9	1,7	0	0		2,9	0	4,4	1,8	1,0	3,2
Glu	**6,9**	**11,8**	**8,9**	**15,2**	**12,0**	**11,1**		5,7	**8,1**	**9,7**	**9,3**	**15,2**	**8,9**
Gln	4,6	**6,9**	6,4	**13,6**	**12,0**	0		4,1	4,4	5,6	4,1	4,9	3,8
Ile	6,6	4,5	6,4	5,1	**12,0**	**5,5**		4,7	**8,1**	4,8	6,3	5,3	3,8
Lys	6,7	**6,9**	6,4	6,8	**8,0**	**5,5**		**7,7**	**6,2**	**6,3**	4,4	**7,0**	4,5
Trp	1,2	2,0	0,6	1,7	0	0		2,2	1,2	1,6	2,9	2,1	1,9
Tyr	3,3	4,9	7,0	1,7	**4,0**	**11,1**		4,0	5,0	3,8	3,1	2,5	1,9

кислот со свойствами аминокислот, находящихся в i-м положении двойного звенного цикла. Как видно из таблицы, циклы правой стороны MBM, образованные операторами связности Asp, Asn и Arg содержат повышенное содержание противоположных по свойствам боковых цепей: для Asp это Arg, Glu, Gln, Lys; для Asn — Asp, Glu, Gln; для Arg — Asp, Glu. Та же тенденция прослеживается для циклов, образованных операторами левой стороны MBM: для Glu–Arg, Lys; для Gln — Asp, Arg, Glu, Gln, Lys; для Lys — Ser, Thr, Asp, Glu.

Для редко встречающихся циклов с Tyr можно отметить повышенную частоту встречаемости Pro (16,7 %) и Asp (33,3 %).

Эти данные, как мы предположили, обусловлены образованием водородных связей между боковыми цепями i-го и $(i-4)$-го остатков. Структурный анализ 4-х-звенных белковых фрагментов с участием упомянутых выше аминокислот (см. далее раздел 9.2.4) подтвердил справедливость нашего предположения.

Таблица 9.5

Частоты встречаемости аминокислот, расположенных внутри 4-х-звенных циклов в $i-4$-м положении (%)

AA	Thr	Glu	Gln	Lys	Trp	Tyr		Ser	Cys	Asp	Asn	Arg	His
n	943	245	157	59	25	18		827	160	640	653	243	157
Gly	6,0	2,4	5,1	3,4	**12,0**	5,5		5,4	5,0	5,8	3,5	10,3	5,1
Pro	1,5	5,3	2,5	1,7	**8,0**	**16,7**		3,9	3,1	1,4	1,8	3,7	2,5
Ala	**10,1**	**9,4**	**7,0**	**11,9**	**8,0**	5,5		12,4	**7,5**	4,4	**7,7**	**10,3**	**8,3**
Leu	**9,5**	5,3	9,5	1,7	**4,0**	0		**8,5**	**18,1**	5,5	6,6	4,9	**15,9**
Ser	6,9	4,9	6,4	**10,2**	**8,0**	5,5		6,6	7,5	5,2	6,1	3,7	8,9
Cys	1,1	0,8	0,6	**0**	4,0	0		0,5	2,5	1,3	0,1	1,6	2,5
Asp	5,4	6,1	**10,8**	**18,6**	4,0	**33,3**		8,1	2,5	5,9	**8,3**	**9,9**	**6,4**
Asn	4,8	6,5	7,0	**0**	**0**	0		3,7	2,5	4,8	4,0	3,3	3,8
Val	6,5	2,9	3,8	**0**	**0**	0		5,9	**11,2**	2,3	6,7	1,5	2,5
Arg	5,4	**9,4**	**7,6**	5,1	**8,0**	**11,1**		6,3	3,1	**7,0**	6,3	6,2	2,5
His	2,2	2,0	0,6	1,7	4,0	5,5		2,3	1,2	0,7	2,4	1,2	1,3
Phe	3,1	0,8	0,6	1,7	**8,0**	5,5		4,0	6,9	0,9	3,5	3,7	**9,5**
Thr	5,7	5,7	5,7	**11,9**	4,0	0		3,9	4,4	3,4	4,7	5,3	1,9
Met	2,3	3,3	2,5	1,7	**0**	0		2,1	4,4	2,0	1,5	2,5	2,5
Glu	8,7	7,3	**9,5**	**16,9**	**8,0**	0		6,9	5,0	**8,6**	**12,1**	**11,1**	5,7
Gln	4,9	**9,0**	**7,0**	3,4	**0**	5,5		3,7	3,1	**14,4**	**7,3**	5,3	4,5
Ile	5,2	1,2	2,5	1,7	**8,0**	5,5		4,3	6,2	1,4	5,7	1,2	4,5
Lys	6,1	**15,1**	**7,6**	5,1	4,0	0		7,5	3,1	**23,8**	5,0	3,7	6,4
Trp	1,5	0,4	2,5	**0**	4,0	0		1,8	1,9	0,2	2,0	1,6	0,6
Tyr	3,1	2,0	3,2	3,4	4,0	0		2,1	0,6	0,9	3,8	3,3	4,5

9.2.3.1. ***Обоснование и методические особенности подхода.*** Выделенные нами двойные циклы с участием боковых цепей аминокислот, (как мы упоминали, их почти 4000), помимо статистического анализа были использованы для проверки идеи MBM. Сразу отметим, что задача полного анализа всех циклов, образованных боковыми цепями, пока не завершена. По этой причине мы ограничились рассмотрением циклов, образованных четырьмя аминокислотами: Glu, Asp, Lys, Arg, которые воссоздают, согласно модели MBM, четыре вектора, связанных симметричными преобразованиями. Как видно на рис. 8.33, вершины, к которым приписаны пары Glu–Asp и Lys–Arg связаны симметрией по отношению к плоскости I, а пары Glu–Lys и Asp–Arg — осевой симметрией при вращении относительно плоскости III. Наконец, пары Glu–Arg и Lys–Asp приписаны к вершинам, связанным векторами, образующими диаметр MBM. Все эти особенности, а также то, что данная группа аминокислот расположена в экваториальной зоне MBM, делает ее удобным «пробным камнем» для экспериментальной проверки подхода. Однако при интерпретации результатов необходимо иметь в виду, что этот анализ имеет дело с уже окончательно сложившейся структурой, тогда как работа боковых цепей в составе векторной машины проходит в условиях ее формирования.

Для работы были выбраны структуры, исследованные с наибольшей точностью, которая определялась количеством циклов в группе — где их было много, использовали большее разрешение (от 1,0 до 1,8 Å), где мало — меньшее (до 2,2 Å). С помощью программы Protein 3D, каждый цикл рассматривали в двух проекциях (вид сверху, как на рис. 8.33, и вид сбоку, как на рис. 8.34). Для правильного сравнения каждое положение ориентировали единообразно. Обычно на виде сверху, как и в модели (рис. 8.33.) справа от водородной связи $N_iH\ldots O_{i-4}$=C α-углеродный атом располагали, а водородную связь направляли параллельно боковым сторонам рисунка. С каждой проекции делали принт-файл. После обработки все принт-файлы были использованы для суммарной таблицы, в которой проводилась их сортировка по сходству конформаций. Ниже в таблицах приведены наиболее характерные из полученных принт-файлов. Лишние детали на них удалены в графическом редакторе, водородные связи обозначены пунктирными линиями. При этом, поскольку данных о положении атомов водорода в структурах, как правило, нет, то и в принт-файлах, получаемых нашей программой, их также нет. Однако при обсуждении мы будем их, по возможности, приводить. В табл. 9.7 приведенные принт-файлы соответствуют первым названиям файлов и номерам аминокислот, выделенных жирным шрифтом в столбцах справа. Остальные аналогичные циклы (а иногда, когда их много, лишь часть) приводятся ниже в этих же столбцах.

Идеальной количественной характеристикой циклов является приведение координат полученных циклов к координатам относительно какой-либо точки, приятым за нулевые (например, координаты α-углеродного атома) и вычисление срединного отклонения. По завершении анализа всех структур проведение этой работы планируется. В данный момент, на этапе первичной оценки перспективности проведения этой работы, в качестве количественной характеристики были использованы величины углов наклона, измеренные непосредственно с принт-файлов на виде сверху и виде сбоку. Поскольку эти величины не очень точны, то их статистическую обработку не проводили, а давали лишь крайние пределы отклонений.

9.2.3.2. ***Анализ циклов глютаминовой и аспарагиновой кислоты.*** **Глютаминовая кислота.** В белках, исследованных с разрешением до 2,1 ангстрема, было проанализировано 133 цикла образованных глютаминовой кислотой, которые в результате анализа естественным образом подразделились на три группы. Все возможные варианты, наклона водородной связи обнаруженные среди этих циклов, отражены в табл. 9.6, а типичный вид этих циклов показан в табл. 9.7.

Таблица 9.6

Варианты наклона водородной связи, обнаруженные для циклов с глютаминовой кислотой

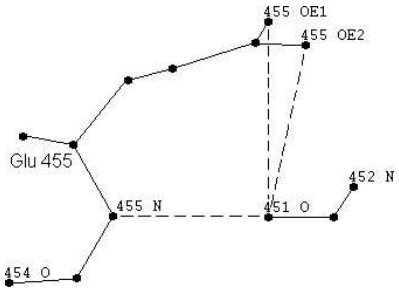
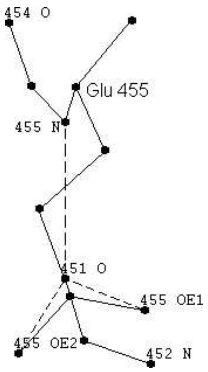
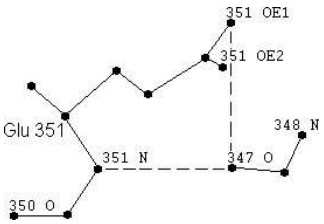
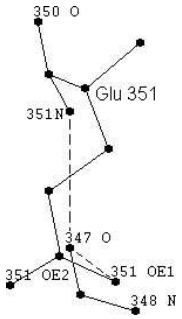
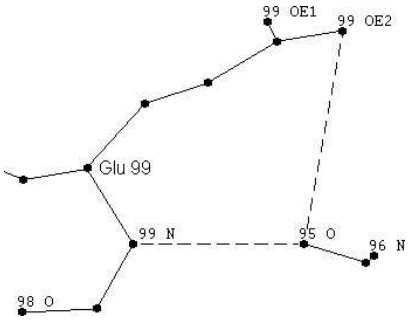
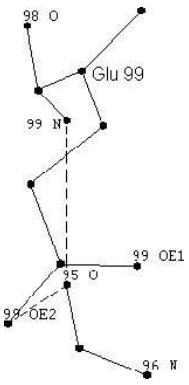
№	Варианты наклона водородной связи		Кол-во циклов	% от общ. (133)
	Вид сбоку	Вид сверху		
	1. Циклы с «симметричной» водородной связью		11	8,3
2	влево-центр-вправо	вправо	11	8,3
3	вправо	влево	11	8,3
	2. Водородная связь с OE1 атомом боковой цепи		61	45,86
1	влево	вправо	1	0,75
2	влево-центр-вправо	вправо	**51**	**38,35**
3	влево	влево	9	6,77
4	вправо	влево	0	0
	2. Водородная связь с OE2 атомом боковой цепи		61	45,86
1	вправо	влево	**48**	**36,09**
2	вправо	вправо	6	4,51
3	влево	вправо	2	1,50
4	влево	влево	5	3,76

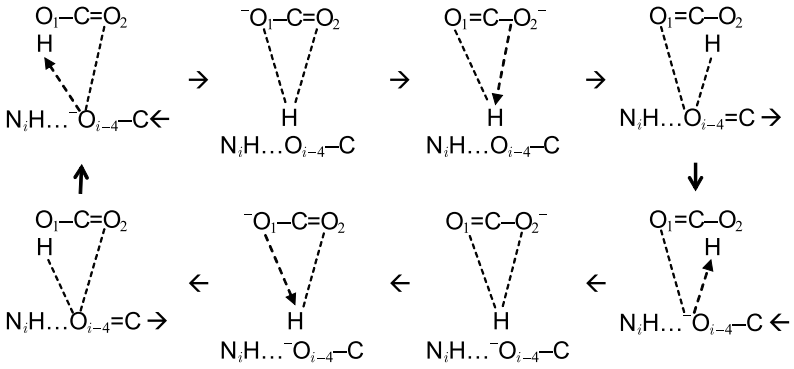
В группу 1 вошли циклы, у которых оба атома кислорода боковой цепи (OE1 и OE2) оказались расположенными в пределах образования водородной связи. Условно эти циклы названы циклами с «симметричной» водородной связью. Таких циклов программа выявила всего 11 (8,3 %). Водородная связь у них, как показано пунктиром на рисунках в табл. 9.7, может образоваться с тем и другим атомами кислорода. Это означает, что при переносе заряда (раздел 5.2.) протон может переходить попеременно от одного атома кислорода к другому. Мы рассмотрели этот процесс более подробно на схеме 9.12. Как следует из этой схемы, в процессе переноса заряда атом водорода может переходить от атома O_1 карбоксильной группы боковой цепи к кислороду O_{i-4}=C–N-группы основной цепи. В самой карбоксильного группе будет происходить перемещение двойной связи и заряда на атом O_2. Этот заряд который будет притягивать обратно атом водорода от основной цепи, что показано на верхнем ряду схемы 9.12.

Этот же процесс, но в обратном направлении, показан на нижней части схемы. При определении того, с каким из атомов HO–C=O-группы образована водород-

Таблица 9.7

Типичные варианты циклов для боковой цепи глютаминовой кислоты

Вид сбоку	Вид сверху	Файлы PDB	*i*-я АК
1. Циклы с «симметричной» водородной связью (11 циклов)			
		**1lci** 1e7q 1ddg 6q21 1sbp 5tnc	**455** 87 568 91 231 63
2. Водородная связь с OE1 атомом боковой цепи (61 цикл)			
		**1req** 1coy 1e19 1fec 1gpl 1g17 1lcf 1pda 3rab 1srr	**351** 133 225 293 74 120 51 305 185 95
3. Водородная связь с OE2 атомом боковой цепи (61 цикл)			
		**1ah7** 1agd 1aky 1a3d 1cfr 1cpq 1euc 1e18 1e6y 1gdo 1otg 1ytb	**99** 76 52 55 84 8 208 228 14 60 82 37



(9.12)

ная связь, преимущество отдавали атому, имеющему более короткое расстояние от O_{i-4}=C-группы. Как видно из табл. 9.7, боковая цепь Glu ориентирована справа налево, а ее HO–C=O-группа располагается практически над O_{i-4}=C-группой основной цепи, причем справа от водородной связи, обычно располагался атом OE1, а слева — OE2.

Такое положение боковой цепи было выявлено также для второй и третьей групп, в которые вошли варианты с водородной связью, образованные, соответственно, атомом OE1 и OE2. Так, в группе с водородной связью OE1 (вариант 2), которая содержала 61 цикл (45,86 %), был найден 51 цикл (**38,35** %, а по отношению к группе это составило 83,6 %), в которых атом OE1 на виде сверху располагался справа от связи $N_iH\ldots O_{i-4}$=C, а угол наклона был направлен вниз (пределы наклона от 110 до 140°). На виде сбоку эта связь была обычно перпендикулярно $N_iH\ldots O_{i-4}$=C связи, либо слегка отклонялась вправо или влево (до 10°). Сама боковая цепь при этом на виде сверху отклонена влево по отношению к водородной связи $N_iH\ldots O_{i-4}$=C. Типичный пример такого расположения, цикл **1req,** Glu **351**, приведен в табл. 9.7. Сравнение варианта 2 с «симметричной» водородной связью показывает, что его связь OE1 $H\ldots O_{i-4}$=C имеет сходный с вариантом 1 характер, с той разницей, что атом OE2 находится за пределами возможной водородной связи (поднят вверх или смещен влево).

Из оставшихся 10 циклов девять имели на виде сверху наклон водородной связи влево вверх (углы порядка 115–140°), а на виде сбоку — резко влево (примерно от 55 до 75°). Анализ этих структур позволил выявить следующие возможные причины отклонений от типичного варианта: а) цикл находится в начале или в конце спирали (циклы 1qht, Glu 330 и 1sbp, Glu 74); б) образована водородная связь с последующей боковой цепью (например, в цикле 1pii, Glu 17 образует H-связь с Lys 20); в) цикл расположен в изломе спирали (циклы 1ddt, Glu 232 и 2ak3, Glu 179). Не исключены и другие возможные причины. В целом, однако, в выборке преобладали циклы, подобные варианту 2.

К группе 3, с водородной связью OE2 $H\ldots O_{i-4}$=C был отнесен также 61 цикл (45,86 %), из которых 48 вариантов (36,09 %, а по отношению к этой группе — 78,7 %), т. е. почти столько же, сколько для варианта 2, имели конформацию, показанную в табл. 9.6. Как следует из рисунка (цикл **1ah7, Glu 99**), на виде сверху атом OE2 располагается слева от водородной связи $N_iH\ldots O_{i-4}$=C, причем водородная связь направлена влево вниз, а на виде сбоку эта связь направлена вправо. Как

показал анализ, угол на виде сверху варьировал от 30 до 65°, а на виде сбоку — от 95 до 115°. Оставшиеся 12 циклов этой группы вариантов были представлены различными вариантами (табл. 9.6.). Детальный анализ появления этих вариантов пока не входил в нашу задачу.

В целом можно сказать, что около 75 % циклов во 2-й и 3-й группах представлены одной конформацией, что указывает на возможность существовании практически лишь двух векторов для боковой цепи глютаминовой кислоты.

Аспарагиновая кислота. Согласно табл. 9.1, в использованной для работы выборке белковых структур было найдено 640 циклов аспарагиновой кислоты. После отбора структур с разрешением не ниже 1,8 Åосталось 168 циклов, на которых был проведен данный анализ. Как и для циклов с Glu, циклы подразделились на три группы (табл. 9.8), однако их соотношение коренным образом изменилось. Самой большой оказалась группа циклов с «симметричной» водородной связь, в которой атомы OD1 и OD2 находятся в пределах длины водородной связи до атома O_{i-4}. Общее их число, как показано в табл. 9.8, составило 116 (69,0 %). Это, вероятно, указывает на важность участия HO–C=O-группы Asp в процессах переноса зарядов, сопряженных с перемещением протонов (см. схему 9.12). В то же время, было найдено, что количество циклов, с водородной связью, образованной атомом OD1, составило 18 (10,7 %), а атомом OD2–34 (20,2 %).

Циклы первой группы визуально программа Protein 3D не различала. Однако измерения расстояний между атомами OD1, OD2 боковой цепи и O_{i-4}=C, проведенные на этой же программе, выявили различия, которые позволили подразделить их на три подгруппы. В первую подгруппу вошли циклы с полностью симметричной водородной связью (расстояния OD1…O_{i-4}=C и

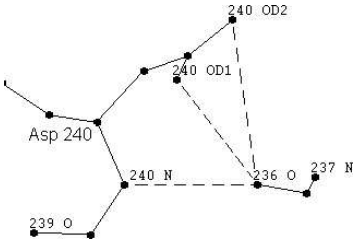
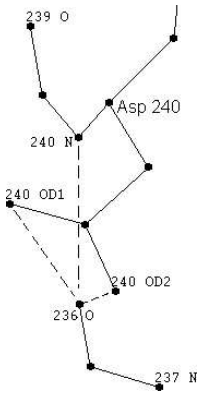
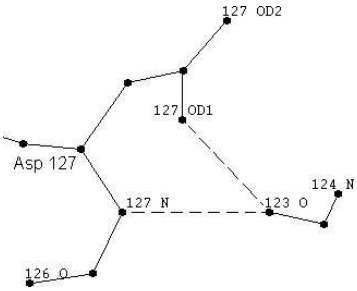
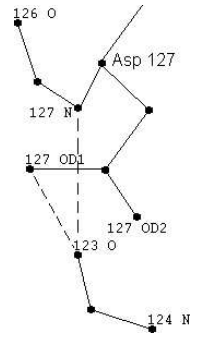
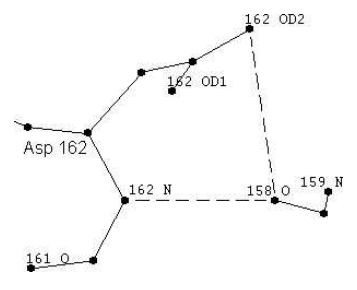
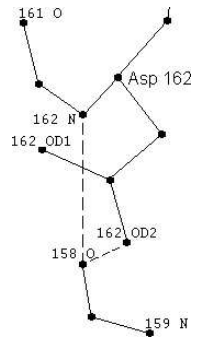
OD2…O_{i-4}=C различались не более чем на 0,03 Å). Таких оказалось 19 (16,4 % от числа циклов этой группы). Во вторую группу были включены циклы, в которых длина связи OD1…O_{i-4}=C была меньше, чем OD2…O_{i-4}=C — 37 циклов (31,9 %). Наконец, в третью группу вошли циклы с длиной связи OD1…O_{i-4}=C большей, чем OD2…O_{i-4}=C — 60 циклов (51,7 %). Если считать, что в циклах первой группы водородная связь образована атомом с более коротким расстоянием, и учесть циклы третьей группы, то можно считать, что чаще других встречаются циклы с водородной связью OD2H…O_{i-4}=C.

Анализ углов наклона для симметричных циклов позволил установить, что на виде сверху угол между N_iH…O_{i-4}=C, OD1…O_{i-4}=C и OD2…O_{i-4}=C варьировал, соответственно, от 135 до 160° и от 70 до 110°. Иными словами, эти углы были ориентированы преимущественно вверх, но связь OD1…O_{i-4}=C была наклонена влево, а OD2…O_{i-4}=C — вправо. На виде сбоку оба угла были наклонены влево, в сторону атома N_i, и варьировали для связи OD1…O_{i-4}=C от 40 до 60°, а для связи OD2…O_{i-4}=C от 70 до 80°. При этом существенной разницы внутри подгрупп не наблюдалось. Для групп с водородной связью OD1H…O_{i-4}=C и OD2H…O_{i-4}=C углы наклона водородной связи варьировали в тех же пределах, что и для соответствующих связей в первой группе. Подавляющее число циклов в этих группах были представлены, как и в случае с Glu, одной конформацией.

9.2.3.3. ***Анализ циклов, образованных лизином и аргинином.*** **Лизин.** Нами было проанализировано 70 двойных циклов, образованных боковой цепью лизина.

Таблица 9.8

Типичные варианты циклов для боковой цепи аспарагиновой кислоты

Вид сбоку	Вид сверху	Файлы PDB	*i*-я АК
1. Циклы с «симметричной» водородной связью (116 циклов)			
		**1ah7** 1exr 1d8w 1gai 2gst 2gst 1pam 1php 1rcf 7xia	**240** 122 86 330 97 182 220 305 24 80
2. Водородная связь с OD1 атомом боковой цепи (18 циклов)			
		**1bw9** 1a4d 1cpc 1bp2 1ezm 1hbg 1lh4 1sdh 2ilk 2mhr	**127** 93 87 49 89 136 151 43 55 79
3. Водородная связь с OD2 атомом боковой цепи (34 цикла)			
		**1nah** 1ah7 1ah7 1aky 1amf 1flp 1luc 1pam 3lzm 4hhb	**162** 150 210 74 64 34 89 123 10 85

Были найдены следующие четыре варианта наклона водородной связи Lys по отношению к вертикальной оси (табл. 9.9)

Таблица 9.9

Варианты наклона водородной связи в циклах, образованных боковой цепью Lys

№	Вид сбоку	Вид сверху	Количество циклов
1	влево	вправо	2
2	вправо	вправо	**19**
3	влево	влево	9
4	вправо	влево	**40**

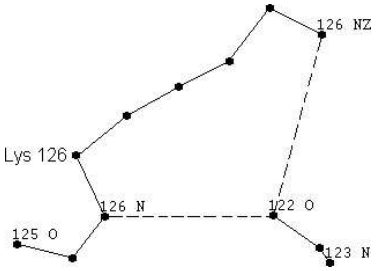
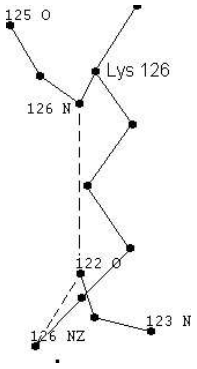
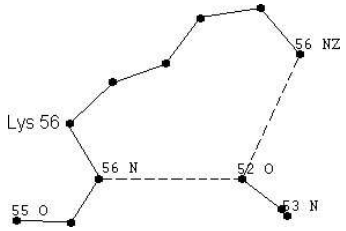
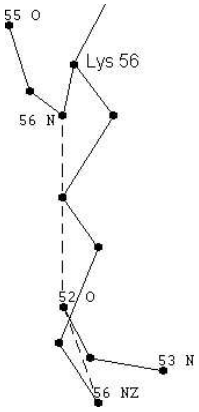
Как видно из таблицы, 40 циклов имеет наклон водородной связи влево (вид сверху) и вправо (вид сбоку). Именно этот вариант следует из идеи МВМ. Вместе с тем, довольно большое число циклов (19) имеет наклон водородной связи вправо (вид сверху) и вправо (вид сбоку). Мы предполагаем, что именно эти варианты и должны рассматриваться как две основные конформации Lys. Две пары полученных для них характерных принт-файлов показаны в табл. 9.10. Другие два варианта имеют вид напряженных циклов, и, как мы предполагаем, являются особыми случаями.

Из табл. 9.10 следует, что обе конформации боковой цепи Lys весьма схожи. Отличия состоят, в основном, в ориентации терминальной C–NH_2-группы. Для первой группы (файл **2f02)** она развернута влево вниз, что хорошо видно на виде сверху, а для второй (файл **1irb)** – вправо вниз. Наличие двух конформаций для Lys, воссоздающих свои вектора направления в пределах узкого пучка, свидетельствует в пользу идеи двухъярусной МВМ. Анализ углов наклона водородной связи позволил установить, что для первой группы они варьируют в пределах от 10 до 50° на виде сверху и в пределах от 100 до 115° на виде сбоку. Для второй группы они изменялись в пределах от 120 до 160° на виде сверху и от 105 до 125° — на виде сбоку.

Аргинин. Боковая цепь аргинина уже рассматривалась нами в гл. 8. Там было сказано, что в результате анализа водородных связей было найдено 6 групп конформаций, каждая из которых характеризуется своим углом наклона водородной связи. Из общего числа в 141 цикл, 60 циклов содержали связь NE…O_{i-4}(см. табл. 9.11). Связь NH1…O_{i-4}=C имели 87 циклов, связь NH2…O_{i-4}=C — всего 4 цикла. Следует отметить, что атом NH1 имеет одинарную связь, а NH2 — двойную, но благодаря вращению вокруг связи NE–CZ они могут принимать одно и то же положение. Кроме того, вследствие резонанса двойной связи эти атомы также могут обозначаться и как NH1, NH2, и, наоборот, как NH2, NH1: NH1–C=NH2 ↔ NH2=C–NH1. Из-за этого сходства для связи NH1…O_{i-4}=C довольно трудно принять одно и то же положение. Вследствие этого, вероятно, вид связей NH1…O_{i-4}=C и NH2…O_{i-4}=C, показанных в табл. 9.11, оказался очень сходным. Парные сочетания водородных связей NE, NH1–O_{i-4}=C и NE, NH2H–O_{i-4}=C по этой же причине были объединены в одну группу. Общее число этих сочетаний, которое нами было проанализировано, составило — 10 циклов. Очень редко встречается вариант NH1, NH2…O_{i-4}=C — нами было найдено всего 2 цикла. Наконец, для сочетания из трех водородных связей NE, NH1, NH2–O_{i-4}=C было найдено 7 циклов.

Таблица 9.10

Типичные варианты циклов для боковой цепи лизина

Вид сбоку	Вид сверху	Файлы PDB	i-я АК
1. Наклон Н-связи влево вниз (вид сверху) и вправо (вид сбоку)			
		**2f02** 1gif 1tad 1f3u 1kev 1fec 2cts 1emj 1ewf	**126** 78 128 33 229 383 181 114 27
2. Наклон Н-связи вправо вниз (вид сверху) и вправо (вид сбоку)			
		**1irb** 1aky 1aky 1dek 1aso 1xdp 1ois 3bby 1dv2 1phk	**56** 55 174 235 248 79 215 139 125 261

Общий вывод из проведенной работы: водородные связи атомов NE и NH2 (когда он справа) аргининов на «виде сверху» имели наклон вправо, атома NH1 (когда он слева) — влево. Что касается «вида сбоку», то результаты были следующими. Из 60-ти циклов Arg, имевших водородную связь NEH…O_{i-4}=C, лишь три имели на рисунках «вид сбоку» наклон влево, 7 — практически не имели наклона, остальные 50 были наклонены вправо. Водородная связь NH1…O_{i-4}=C, по сравнению с предыдущей, более круто отклонена вправо. Поэтому не удивительно, что из 80 циклов Arg, имевших такую связь, лишь в одном случае водородная связь была слегка отклонена влево, в остальных случаях — только вправо. Для небольшой выборки циклов, в которых была найдена водородная связь NH2…O_{i-4}=C, водородная связь также была наклонена только вправо. Для вариантов NE, NH1–O_{i-4}=C+NE, NH2–O_{i-4}=C

Таблица 9.11

Типичные варианты циклов для боковой цепи аргинина

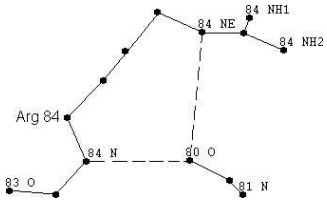
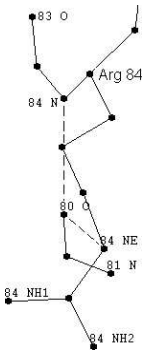
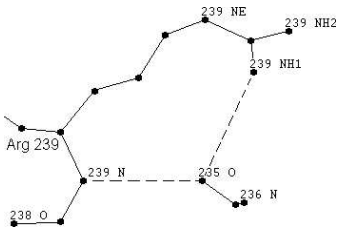
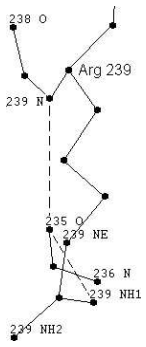
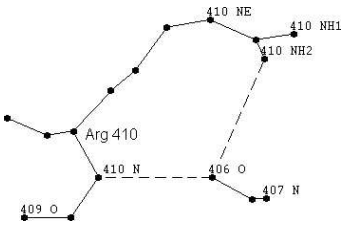
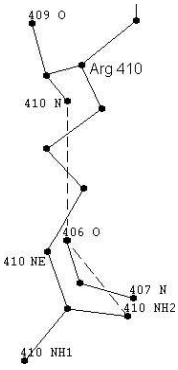
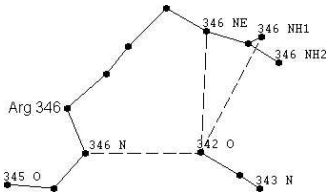
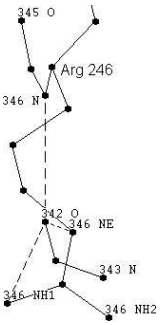
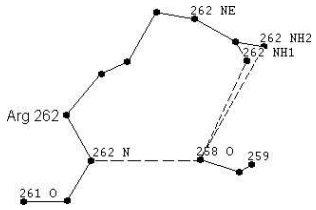
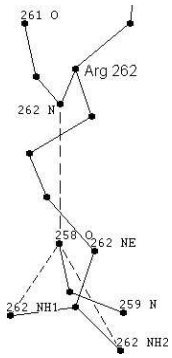
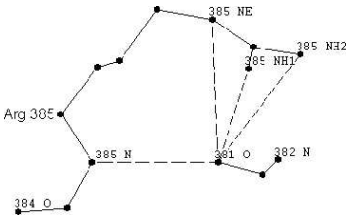
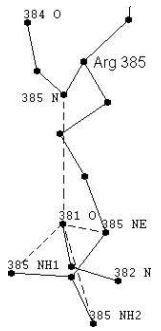
Вид сбоку	Вид сверху	Файлы PDB	i-я АК
Водородная связь NE–O_{i-4} (50 циклов)			
		**1d8w** 1gnd 1agd 1a71 1fjl 1dad 1vin 2cgp 2gst 2mbn	**84** 240 169 363 57 60 293 185 93 139
Водородная связь NH1–O_{i-4} (87 циклов)			
		**1gox** 1ddg 1dek 1e19 1kax 1lpe 1pgd 1tad 1trk 5tnc 7xia	**239** 533 186 35 247 136 113 82 659 47 331
Водородная связь NH2–O_{i-4} (4 цикла)			
		**5acn** 1pta 1amw 1tib	**410** 280 196 133

Таблица 9.11 (*окончание*)

Вид сбоку	Вид сверху	Файлы PDB	i-я АК
Водородные связи NE, NH1–O_{i-4}+NE, NH2–O_{i-4} (10 циклов)			
		**1bw9** 1ald 1cdw 1e18 1exr 1got 1j09 1jdd 1pgd 1req	**346** 55 235 130 37 13 461 346 381 500
Водородные связи NH1, NH2–O_{i-4} (2 цикла)			
		**1j7k** 1dld 1r8b	**262** 247 50
Водородные связи NE, NH1, NH2–O_{i-4} (7 циклов)			
		**1j09** 1a5z 1j09 1rfq 2eck 3a3h 1dtl	**385** 118 319 262 36 211 46

и NE, NH1, NH2–O_{i-4}=C, в которых присутствует связь NEH…O_{i-4}=C можно отметить приближение этой связи к нормали (см. табл. 9.11), однако результирующая

этих двух вариантов все равно остается с наклоном вправо. То же можно сказать и для варианта NH1,NH2–O_{i-4}=C. Нами были измерены вариации углов для всех типов водородных связей. Для связи NEH…O_{i-4}=C этот угол он варьировал во всех вариантах на виде сверху от 90° до 120° и на виде сбоку от 90° до 105°. Что касается углов водородных связей для атомов NH1 и NH2, то вследствие отмеченных выше причин (вращения и резонанса структур) эти углы перекрывались и варьировали в пределах от 100° до 160° на виде сверху и от 120° до 140° на виде сбоку.

9.2.3.4. ***Обсуждение результатов. Построение приближенной схемы фрагмента молекулярной векторной машины.*** Полученный нами фактический материал, как мы упоминали в разделе 9.2.3.1, предполагается обработать до получения усредненных координат однотипных двойных циклов и построения на этой основе структурной модели. На данном этапе, для предварительной оценки мы предприняли попытку построения схемы фрагмента МВМ (рис. 9.4.) на основе рассмотренных выше четырех типов циклов — Glu, Asp, Lys, Arg, что, как мы полагаем, позволит обсудить предварительные результаты проведенной работы. При построении схемы были использованы рисунки для приведенных в таблицах 9.7, 9.8, 9.10 и 9.11 циклов. Чтобы не дублировать, все возможные водородные связи для каждой боковой цепи показаны на одной функциональной группе. В лизине терминальные группы имеют

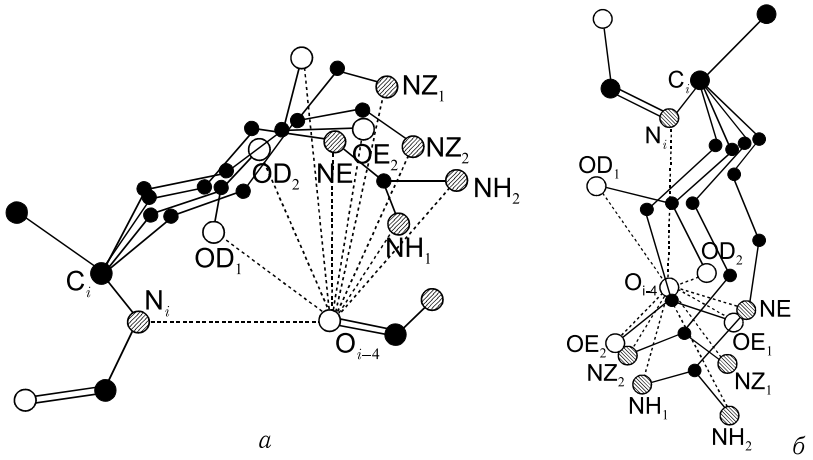


Рис. 9.4. Схема расположения боковых цепей во фрагменте молекулярной векторной машины на основе четырех боковых цепей — Asp, Glu, Lys, Arg: *а* — вид сбоку; *б* — вид сверху. Черными кружками обозначен углерод, белыми — кислород, заштрихованными — азот; водородные связи — пунктирные линии. Обозначения атомов: OD1, OD2–Asp, OE1, OE2–Glu, NZ1, NZ2 — положения аминогруппы Lys, NE, NH1, NH2–Arg

два положения, поэтому они оба показаны и обозначены как NZ_1 и NZ_2.

Анализ схемы позволяет сделать следующие предварительные выводы:

1. Альфа углеродный атом расположен, как и в МВМ, справа от связи N_iH… …O_{i-4}.

2. Все функциональные группы расположились над связью N_iH…O_{i-4}, но в отличие от модели МВМ, часть атомов находится справа от этой связи, а другая часть — слева, что хорошо видно на виде сверху (рис. 9.4, *б*).

3. На виде сверху водородные связи для атомов кислорода Asp имеют наклон вверх, для остальных атомов — вниз. На виде сбоку — для атомов кислорода Asp и OE_1 Glu водородные связи имеют наклон влево, для OE_2 Glu и NEArg эти связи примерно перпендикулярны, для атомов остальных боковых цепей эти связи наклонены вправо.

4. Боковые цепи Asp, Glu и Lys имеют по два варианта водородных связей, Arg, с учетом сочетаний — шесть вариантов.

Приведенные предварительные выводы показывают, с одной стороны, что MBM, скорее всего, будет иметь число направлений 61–62 и будет соответствовать модели

Таблица 9.12

Частоты встречаемости структурно-функциональных блоков ближнего порядка

***i* − 4 АК**		Ser		**Cys**		**Asp**		**Asn**		**Arg**		**His**	
i АК			**%**		**%**		**%**		**%**		**%**		**%**
Ser	Σ	51		4		57		29		45		16	
	H-b	0	0	**1**	**25,0**	**2**	**3,5**	**1**	**3,4**	**3**	**6,7**	**4**	**25,0**
Cys	Σ	12		4		4		4		5		2	
	H-b	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Asp	Σ	32		8		37		27		45		5	
	H-b	0	0	0	0	**1**	**2,7**	**5**	**18,5**	**14**	**31,1**	**1**	**20,0**
Asn	Σ	37		5		45		23		37		13	
	H-b	**5**	**13,5**	**2**	**40,0**	**6**	**13,3**	**4**	**17,4**	**3**	**8,1**	**2**	**15,4**
Arg	Σ	22		4		24		7		14		3	
	H-b	**9**	**40,9**	0	0	**11**	**45,8**	0	0	**3**	**21,4**	**3**	**100**
His	Σ	14		4		10		6		4		2	
	H-b	**4**	**26,7**	0	0	**3**	**30,0**	0	0	**1**	**25,0**	0	0
Thr	Σ	60		9		48		42		48		17	
	H-b	0	0	0	0	**4**	**8,3**	**3**	**7,1**	**1**	**2,1**	**6**	**35,3**
Glu	Σ	12		2		15		16		23		5	
	H-b	**2**	**16,7**	0	0	0	0	**2**	**12,5**	**11**	**47,8**	**1**	**20,0**
Gln	Σ	10		1		17		11		12		1	
	H-b	**5**	**50,0**	0	0	**6**	**35,3**	**7**	**63,6**	**1**	**8,3**	0	0
Lys	Σ	6		0		11		0		3		1	
	H-b	**1**	**16,7**	0	0	**3**	**27,3**	0	0	0	0	0	0
Trp	Σ	2		0		1		0		1		1	
	H-b	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Таблица 9.12 (*окончание*)

$i-4$ АК		Thr		Met		Glu		Gln		Lys		Trp		Tyr	
i АК			%		%		%		%		%		%		%
Ser	Σ	33		15		54		30		57		15		16	
	H-b	0	0	0	0	**4**	**7,4**	**2**	**6,7**	0	0	0	0	0	0
Cys	Σ	7		7		8		5		5		3		1	
	H-b	0	0	0	0	0	0	**2**	**40,0**	0	0	**1**	**33,3**	0	0
Asp	Σ	21		12		50		81		135		1		6	
	H-b	**2**	**9,5**	0	0	**5**	**10,0**	**44**	**54,3**	**71**	**52,6**	0	0	**1**	**16,7**
Asn	Σ	26		9		69		44		28		8		23	
	H-b	**1**	**3,8**	0	0	**11**	**15,9**	**20**	**45,4**	**1**	**3,6**	**7**	**87,5**	**14**	**60,1**
Arg	Σ	12		6		27		13		9		4		8	
	H-b	**2**	**16,7**	**1**	**16,7**	**10**	**37,0**	**2**	**15,4**	0	0	**2**	**50,0**	**2**	**25,0**
His	Σ	3		4		9		7		10		1		7	
	H-b	0	0	0	0	**2**	**22,2**	**1**	**14,3**	**2**	**20,0**	0	0	0	0
Thr	Σ	49		20		76		47		51		13		27	
	H-b	**1**	**2,0**	0	0	**3**	**3,9**	**2**	**4,2**	**2**	**3,9**	0	0	**3**	**11,1**
Glu	Σ	14		8		18		22		36		1		5	
	H-b	0	0	0	0	**5**	**27,8**	**7**	**31,8**	**16**	**44,4**	0	0	0	0
Gln	Σ	9		4		15		7		12		4		5	
	H-b	**1**	**11,1**	**1**	**25,0**	**1**	**6,7**	0	0	0	0	**2**	**50,0**	**2**	**40,0**
Lys	Σ	7		1		10		2		3		0		2	
	H-b	0	0	0	0	**4**	**40,0**	0	0	0	0	0	0	0	0
Trp	Σ	1		0		1		0		1		1		1	
	H-b	0	0	0	0	**1**	**100**	0	0	0	0	0	0	0	0

на рис. 8.18. С другой стороны, не совсем понятно, будет ли эта структура вообще описываться каким-либо известным многогранником или это будет не совсем правильная (но симметричная) структура. Нельзя также исключить, что структура, которая будет построена на существующих водородных связях для 12 боковых цепей, обладающих способностью к их образованию (включая HN-C=O-группу Gly и слабые H-связи Phe), является конечным состоянием боковых цепей. Она может отличаться от исходного состояния, в котором физические операторы находятся в рибосоме на момент синтеза полипептидной цепи.

9.2.4. Взаимоотношения боковых цепей, находящихся в i-м и $(i-4)$-м положениях 4-х-звенных циклов. Структурно-функциональные узлы ближнего

порядка. Анализ структуры 4-х-звенных фрагментов, для которых наблюдалась корреляция боковых цепей, находящихся в i-м и $(i-4)$-м положениях показал, что во многих случаях, хотя и не всегда, это связано с образованием между ними водородных связей. Образующиеся при этом структуры мы будем условно называть структурно-функциональными узлами ближнего порядка (сокращенно — СФУБП или СФУ). Хотя в литературе имеются работы по анализу ряда пар боковых цепей аминокислот, а также отдельных боковых цепей в спиральных фрагментах белков [6–15], систематического анализа таких узлов, насколько нам известно, не проводилось. Мы провели такой анализ с использованием имеющейся в нашем распоряжении выборки 4-х-звенных циклов. В приведенных таблицах в примечаниях будут даны ссылки на названия pdb-файлов белков, в которых найдены 4-х-звенные фрагменты, и номера i-х аминокислот.

9.2.4.1. ***Частоты встречаемости структурно-функциональных узлов.*** С помощью программы Protein 3D мы проанализировали все 4-х-звенные циклы, содержащие в $(i-4)$-м положении боковые цепи, способные образовывать водородные связи (Ser, Cys, Asp, Asn, Arg, His, а также Thr, Met, Glu, Gln, Lys, Trp и Tyr), подсчитали общее число таких циклов (Σ) и количество циклов, образующих СФУ БП (H-b — H-bond). Затем мы рассчитали процент встречаемости (%) СФУ для того или иного типа циклов. Результаты этой работы приведены в табл. 9.6. Сразу отметим, что результаты являются вполне представительными не для всех циклов, поэтому мы рассматриваем их как предварительные и ориентировочные. В этой таблице по вертикали можно сравнивать количество боковых цепей той или иной аминокислоты, найденных в i-4-м положении и количество образуемой ими СФУ, а по горизонтали — проводить сопоставления для какого из 4-х-звенных циклов: с какой боковой цепью наиболее часто встречается СФУ. Порядок расположения аминокислот в этой таблице, как по горизонтали, так и вертикали, аналогичен последовательности столбцов в таблицах 9.2–9.5. При этом тирозин (Tyr) и метионин (Met) не приведены в строках, поскольку боковые цепи обеих аминокислот в i-м положении, не образуют Н-связей в 4-х-звенных циклах. В процессе анализа таблицы мы будем использовать следующие обозначения: 1 — преобразование антисимметрии боковой цепи самой на себя; α — преобразование антисимметрии относительно плоскости I; β — преобразование относительно плоскости II; γ — преобразование относительно плоскости III, также их сочетания $\alpha\beta$, $\alpha\gamma$, $\beta\gamma$, $\alpha\beta\gamma$ (см. раздел 8.5.2.1).

Из таблицы видно, что для боковых цепей Ser и Thr, первой пары в МВМ, несмотря на большие выборки, анализ не выявил образования СФУ между собой. Исключение — пара Thr–Thr (2%) При этом обе аминокислоты чаще образуют СФУ с боковыми цепями правой стороны МВМ — Asp, Asn, Arg. Для Ser часто наблюдаются СФУ с Cys — 25% (преобраз. β), для 9 циклов Thr они не найдены, а для Thr — с Tyr 11% (преобраз. γ), а для Ser, несмотря на большое число циклов (16), они не обнаружены. Для родственных по структуре циклов Cys СФУ найдены лишь с Gln (40%) и Trp (33,3%).

В качестве второй пары боковых цепей в МВМ можно рассматривать Asp и Glu. Обе боковых цепи имеют большие выборки циклов. Для Asp чаще всего встречаются СФУ с Gln (54,0% — преобраз. $\alpha\beta$), Arg (31,0% — преобраз. γ), и Lys (52,6%) (преобраз. $\alpha\gamma$). Сходные, но не идентичные, цифры имеет Glu: с Gln (31,8 % — преобраз. β), Lys (44,4% — преобраз. γ) и Arg (47,8% — преобраз. $\alpha\gamma$). Наиболее

часто встречаются СФУ, в которых боковые цепи с этих аминокислот связаны преобразованием αγ. Отметим также, что эти две боковых цепи наиболее часто образуют СФУ.

Третьей парой боковых цепей в МВМ являются Asn и Gln. Эти боковые цепи имеют большое разнообразие СФУ. Например, для Asn найдены СФУ с Cys (40 % все циклов), Asp (13,3 %), Asn (17,4 %), His (15,4 %), Glu (15,9 %), Gln (45,4 %). Необычно высока для Asn встречаемость СФУ с Trp (85,7 %) и Tyr (60,1 %). Несколько иное распределение СФУ найдено для Gln: с Ser (50 %), Asp (35,3 %), Asn (63,6 %). Для циклов Gln также высока частота встречаемости СФУ с Trp (50,0 %) и Tyr (40,0 %), но данные по этим циклам пока немногочисленны. Связать эти данные с МВМ не удается.

В качестве четвертой пары боковых цепей в МВМ можно рассматривать Arg и Lys. Как можно было ожидать, для Arg часто встречаются СФУ с Asp (45,8 % — преобраз. γ) и Glu (37,0 % — преобраз. αγ). Однако, найдены и другие СФУ с высокой частотой встречаемости: Ser (40,9 %), Arg (21,4 % — преобраз. 1), Thr (16,7 %), Gln (15,4 % — преобраз. αβγ). Для Arg также высока встречаемость СФУ с циклическими боковыми цепями: His (100 %), Trp (50 %) и Tyr (25 %), хотя из-за небольшой выборки эти данные нужно рассматривать как предварительные. Для Lys были найдены практически лишь два типа СФУ: с Asp (27,3 % — преобраз. αγ), Glu (40,0 % — преобраз. γ).

Наконец, пятая, последняя пара циклов в МВМ образуется боковыми цепями His и Trp. Для His характерно образование СФУ с Ser (26,7 % — преобраз. γ), Asp (30,0 %), Glu (22,2 %) и Lys (20,0 %). В то же время, как мы уже упоминали, количество циклов с Trp очень невелико и найден лишь один тип СФУ — с Glu (100 %).

Полученная информация показывает, что для ряда боковых цепей, в первую очередь Asp, Glu, Arg, Lys, имеется связь между характером боковых цепей в i-м и $(i-4)$-м положениях и типом их преобразований в МВМ. Однако, эта информация не вскрывает до конца природу причин преимущественного образования того или иного типа СФУ, что можно сделать на основе анализа их структуры. Результаты этой работы изложены в следующем разделе этой главы. При этом, хотя нами изучены СФУ для всех представленных в таблице пар, для данной главы мы посчитали целесообразным представить результаты лишь для Glu, Asp, Lys и Arg — тех боковых цепей аминокислот, которые рассматривались при обсуждении данных в пользу МВМ (раздел 9.2.3.). Такое ограничение анализа, как мы полагаем, позволит уделить больше внимания природе СФУ.

9.2.4.2. ***Сравнительный анализ структурно-функциональных узлов.*** Прежде чем переходить к сравнительному анализу СФУ, который будет проведен на основе схематических изображений водородных связей с показом стрелками входов в ту или иную группу, необходимо привести хотя бы один пример, как выглядят СФУ в белковых структурах. На рис. 9.5 показана структура СФУ глютаминовой кислоты и лизина, найденного в белке эритрокруорине (один из видов гемоглобина, файл 1eca, Glu 72). Хорошо видно, что атом OE1 Glu 72 образует водородную связь с $(i-4)$-м кислородом основной цепи белка (O 68). В свою очередь, атом NZ Lys 68 также образует водородную связь с OE1 Glu 72.

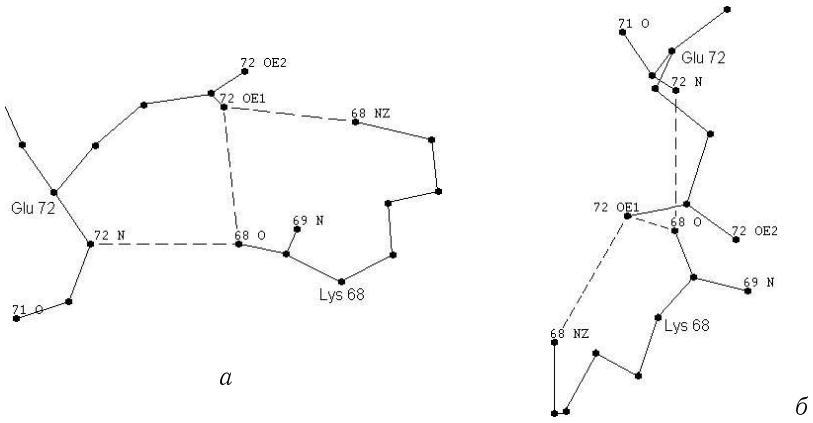


Рис. 9.5. Структурно-функциональный узел глютаминовой кислоты и лизина (файл 1eca, Glu 72): *а* — вид сбоку; *б* — вид сверху; водородные связи — пунктирные линии

Полученные с помощью программы Protein 3D СФУ были проанализированы и представлены в виде схем водородных связей, описывающих те же взаимодействия, что и на рис. 9.5, но в более легко воспринимаемом виде. В табл. 9.13 приведены схемы таких связей для Asp и Glu, а в табл. 9.14 — для Lys и Arg. Кроме схем, в таблицах приведены названия файлов PDB и номера i-х аминокислот, для которых найдены те или иные СФУ.

Глютаминовая и аспарагиновая кислоты. Результаты анализа СФУ, образованных на основе глютаминовой и аспарагиновой кислоты представлены в таблицах, соответственно, 9.13 и 9.14. Найденные СФУ для каждого типа боковой цепи были разделены на две группы. В первую группу вошли СФУ, в которых водородная связь с O_{i-4}=C группой основной цепи образована атомом O1 боковой цепи, а во вторую — СФУ, в которых аналогичная связь образована атомом O2. Все варианты в обеих таблицах пронумерованы аналогичным образом, что позволяет легко сопоставлять любые варианты.

Такое разбиение позволяет провести сравнительный анализ практически всех возможных СФУ, образуемых этими двумя аминокислотами. Кратко опишем те наблюдения, которые можно сделать на основе анализа этих таблиц.

1. Не обнаруживаются СФУ для сочетаний для Glu: с Thr, Cys, Met, Asp, Trp, Tyr; для Asp с Ser, Cys, Met, Asp, Trp.

2. Для обоих типов боковых цепей встречаются сочетания с Glu, Asn, Gln, Lys, Arg, His.

3. Для ряда СФУ наблюдается параллелизм в изменениях связей, например: с Gln (пункты 9–11), Lys (пункты 12, 13), Arg ((пункты 16–18).

4. К числу наиболее распространенных СФУ, как было выявлено на основе статистического анализа, относятся сочетания с Gln, Lys и Arg. Таблицы 9.3. и 9.4 также отражают эту особенность, причем чаще других обнаруживаются варианты 10, 18 и 19 для Asp, а также 11–13 для обоих типов СФУ.

Следует также отметить, что большая часть файлов с Asp и часть файлов с Glu относится к «симметричным», т. е. оба атома кислорода HO–C=O-группы находятся в пределах возможности образования водородных связей. Это означает, что высока

Таблица 9.13

Структурно-функциональные узлы ближнего порядка глютаминовой кислоты

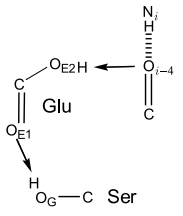
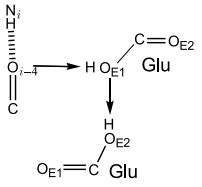
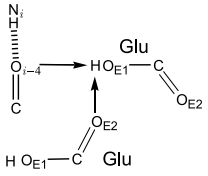
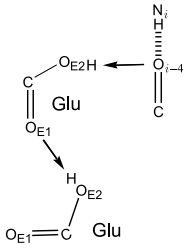
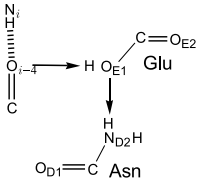
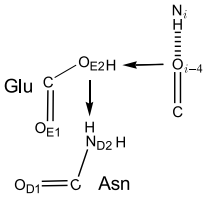
АК $i-4$	Н-связь Glu OE1–O_{i-4}	Файл PDB	i-я АК	АК $i-4$	Н-связь Glu OE2–O_{i-4}	Файл PDB	i-я АК
1.1. Ser	Не найдено			2.1. Ser		3adk 1nsy	62 68
1.2. Thr	Не найдено			2.2. Thr	Не найдено		
1.3.	Glu–Ser, Glu–Thr, Glu–Cys, Glu–Met, Glu–Asp — не найдено			2.3.	Glu–Thr, Glu–Cys, Glu–Met, Glu–Asp — не найдено		
1.4. Glu		1dik	636	2.4. Glu	Не найдено		
1.5. Glu		1ier	60	2.5. Glu		1dap	177
1.6. Asn		1dof	309	2.6. Asn		2rn2	48
1.7. Asn	Не найдено			2.7. Asn	Не найдено		
1.8. Asn	Не найдено			2.8. Asn	Не найдено		

Таблица 9.13 (*продолжение*)

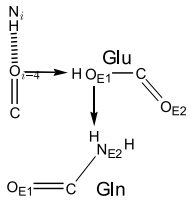
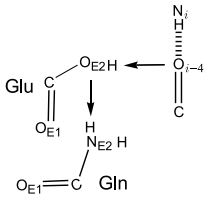
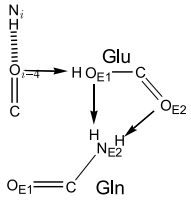
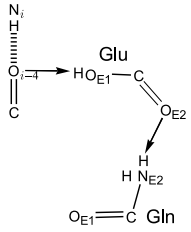
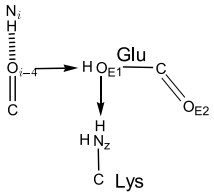
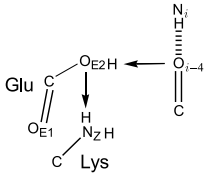
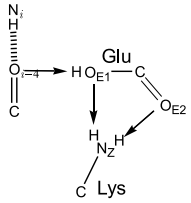
АК $i-4$	H-связь Glu OE1–O_{i-4}	Файл PDB	i-я АК	АК $i-4$	H-связь Glu OE2–O_{i-4}	Файл PDB	i-я АК
1.9. Gln		1ucw	149	2.9. Gln		1apx	17
1.10. Gln		1amp	168	2.10. Gln	Не найдено		
1.11. Gln		1agd 1ddg	148 568	2.11. Gln	Не найдено		
1.12. Lys		1eca 1dik 1set	72 153 85	2.12. Lys		1set	78
1.13. Lys		1lat 1trk 1pox	469 516 272	2.13. Lys	Не найдено		

Таблица 9.13 (*продолжение*)

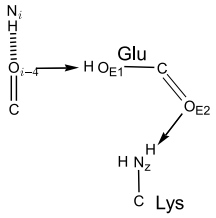
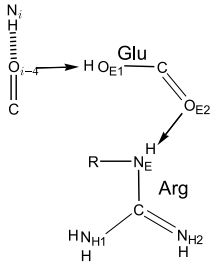
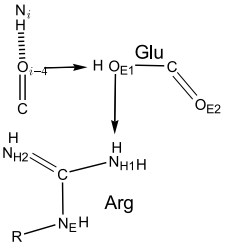
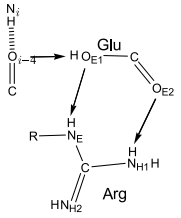
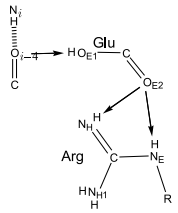
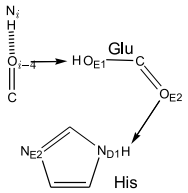
АК $i-4$	H-связь Glu OE1–O_{i-4}	Файл PDB	i-я АК	АК $i-4$	H-связь Glu OE2–O_{i-4}	Файл PDB	i-я АК
1.14. Lys		1vrt 1coz 1req 2crk 1lam	370 60 447 160 209	2.14. Lys	Не найдено		
1.15. Arg		4crx 1e7q	123 24	2.15. Arg	Не найдено		
1.16. Arg		1igs 1afr 1au7	220 339 156	2.17. Arg	Не найдено		
1.17. Arg		1fsa	280	2.18. Arg	Не найдено		
1.18. Arg	Не найдено			2.19. Arg	Не найдено		

Таблица 9.13 (*окончание*)

АК $i-4$	H-связь Glu OE1–O_{i-4}	Файл PDB	i-я АК	АК $i-4$	H-связь Glu OE2–O_{i-4}	Файл PDB	i-я АК
1.19. Arg		1cox 4crx	132 150	2.20. Arg	Не найдено		
1.20. His		1dik	568	2.21. His	Не найдено		
1.21. Tyr	Не найдено			2.22. Tyr	Не найдено		

вероятность перемещения водородной связи с O_{i-4}=C в пределах этой группы, в соответствии со схемой 9.12. Поэтому отсутствие вариантов во многих клетках данной таблицы может, с одной стороны, означать, что эти варианты действительно не встречаются, а с другой — они могут появляться в процессе динамических перестроек водородных связей в процессе переноса зарядов. Нельзя также исключить, что некоторые из представленных вариантов являются промежуточными стадиями процесса перестройки водородных связей. Например, для вариантов 1.9–1.11 Glu такие изменения напрашиваются. Для Asp во втором столбце эти изменения также похожи (см. табл. 9.14, варианты 2.10. и 2.11), но не хватает варианта 2.9. В целом приведенный материал может стимулировать дополнительный поиск отсутствующих вариантов с целью заполнения данной таблицы, который позволит более детально обсудить высказанное предположение.

Лизин и аргинин. Результаты поиска СФУ для этих двух аминокислот приведены в табл. 9.15. Для Arg было найдено, в основном, два типа СФУ, обусловленные образованием H-связи: с Arg NE–O_{i-4} и Arg NH1–O_{i-4}, для которых и построена эта таблица. Были также найдены СФУ Arg для двух водородных связей NE, NH1–O_{i-4} (два варианта) и NH1, NH2–O_{i-4} (один вариант), которые мы не приводим. Кратко описываем полученные результаты:

1. В структуре СФУ, образуемых Lys и Arg, не найдены Asn и Cys.

2. Наиболее распространенными СФУ являются сочетания с Ser, Asp и Glu.

3. Для СФУ с Arg найдены сочетания с Gln, Arg, а также с Met, Tyr, His, Trp, тогда как для Lys их не обнаружено.

В целом, степень разнообразия СФУ для Arg значительно выше, чем для Lys, что связано с образованием Arg водородных связей с NH и NE —атомами. Как и в случае

Таблица 9.14

Структурно-функциональные узлы ближнего порядка аспарагиновой кислоты

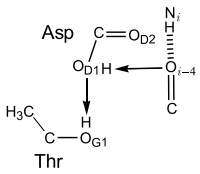
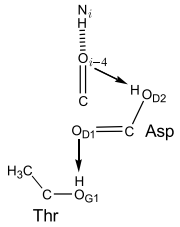
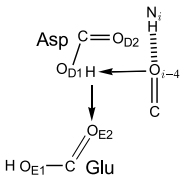
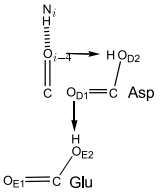
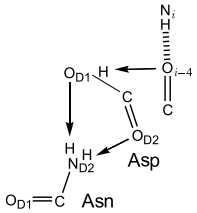
АК $i-4$	H-связь Asp OD1–O_{i-4}	Файл PDB	i-я АК	АК $i-4$	H-связь Asp OD2–O_{i-4}	Файл PDB	i-я АК
1.1. Ser	Не найдено			2.1. Ser	Не найдено		
1.2. Thr		1chk	207	2.2. Thr		1cpc	108
1.3.	Asp–Ser, Asp–Cys, Asp–Met, Asp–Asp — не найдено			2.3.	Asp–Ser, Asp–Cys, Asp–Met, Asp–Asp — не найдено		
1.4. Glu		8atc	200	2.4. Glu	Не найдено		
1.5. Glu	Не найдено			2.5. Glu		1req 1e7f	415 256
1.6. Asn	Не найдено			2.6. Asn	Не найдено		
1.7. Asn		1e6y-a	363	2.7. Asn	Не найдено		

Таблица 9.14 (*продолжение*)

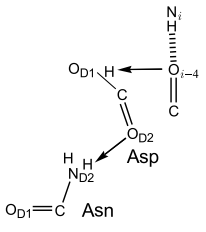
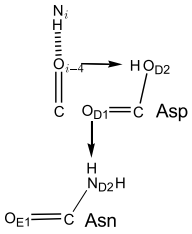
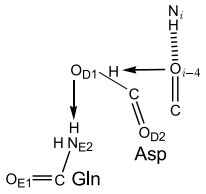
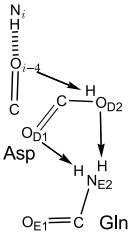
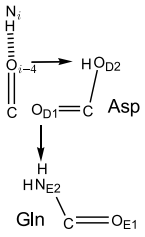
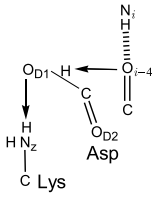
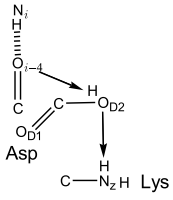
АК $i-4$	H-связь Asp OD1–O_{i-4}	Файл PDB	i-я АК	АК $i-4$	H-связь Asp OD2–O_{i-4}	Файл PDB	i-я АК
1.8. Asn		1b8v	251	2.8. Asn		1e6y-b	251
1.9. Gln		1c7s 1chk 8cat	33 133 497	2.9. Gln	Не найдено		
1.10. Gln	Не найдено			2.10. Gln		1evf 1ash 1ddg 1qhb 1zap 4enl 7xia	13 28 477 456 232 90 352
1.11. Gln	Не найдено			2.11. Gln		1byb 1cay 1rai 1aew	113 162 200 116
1.12. Lys		2cpp 1bnc	182 266	2.12. Lys		1luc 1aky 1gg1 1gg1 1grn 1gsp	206 58 132 198 170 29

Таблица 9.14 (*продолжение*)

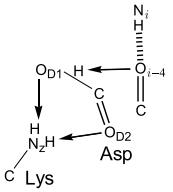
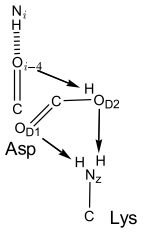
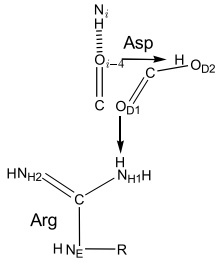
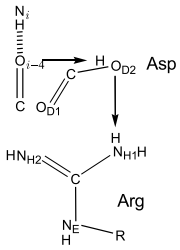
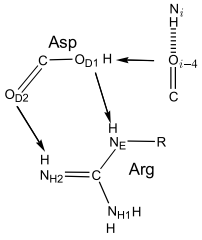
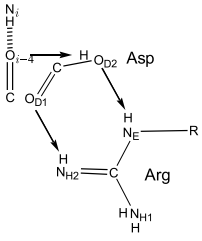
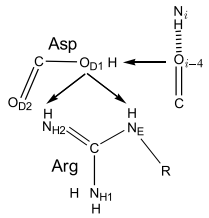
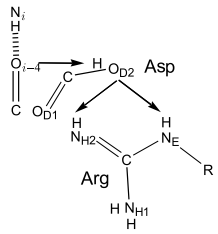
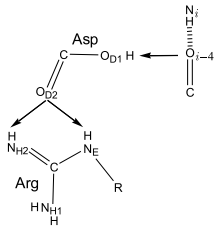
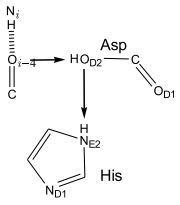
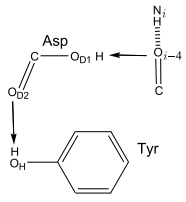
АК $i-4$	H-связь Asp OD1–O_{i-4}	Файл PDB	i-я АК	АК $i-4$	H-связь Asp OD2–O_{i-4}	Файл PDB	i-я АК
1.13. Lys		1c7s 1se4 1dog 1dog 5tnc	250 75 283 382 23	2.13. Lys		1bes 2ebn 1alo 1pgd	261 120 116 380
1.14. Lys	Не найдено			2.14. Lys	Не найдено		
1.15. Arg	Не найдено			2.15. Arg		3rab	155
1.16. Arg	Не найдено			2.16. Arg		1cnt 1cnt	93 175
1.17. Arg		1ann 1qht	278 123	2.17. Arg		1f5z 4crx 1am9 1ucw	35 143 368 53

Таблица 9.14 (*окончание*)

АК $i-4$	Н-связь Asp OD1–O_{i-4}	Файл PDB	i-я АК	АК $i-4$	Н-связь Asp OD2–O_{i-4}	Файл PDB	i-я АК
1.18. Arg		2fx2 1req 1set	28 673 178	2.18. Arg		1req 1ejb	727 32
1.19. Arg		4crx	143	2.19. Arg	Не найдено		
1.20. His	Не найдено			2.20. His		1ecl	570
1.21. Tyr		1qht	315	2.21. Tyr	Не найдено		

с Glu и Asp, для этих атомов образовалось два ряда СФУ. Их анализ показывает, что хотя внешне они имеют аналогичный вид, структура входов и выходов и у них различается.

Следует отметить, что проведенный анализ можно рассматривать как первый этап к построению системы структурно-функциональных узлов, являющихся переходным уровнем от вторичной структуры к третичной. Представленный материал позволяет анализировать и осуществлять целенаправленный поиск новых, еще не обнаруженных СФУ. Кроме того, последующий предполагаемый анализ структуры

Таблица 9.15

Структурно-функциональные узлы ближнего порядка для лизина и аргинина

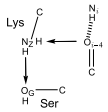
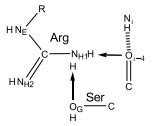
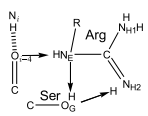
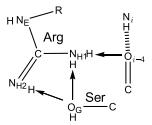
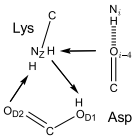
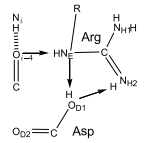
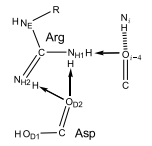
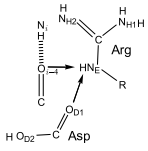
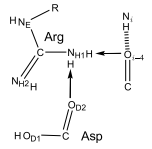
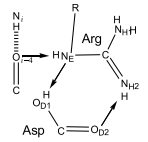
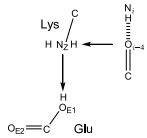
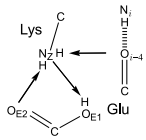
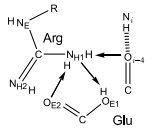
АК $i-4$	Н-связь Lys NZ–O_{i-4}	Файл PDB	i-я АК	Н-связь Arg NE–O_{i-4}	Файл PDB	i-я АК	Н-связь Arg NH1–O_{i-4}	Файл PDB	i-я АК
1. Ser		2rfq 2dgc	336 246	Не найдено				1e7q 1a4i 1awc	21 17 379
2. Ser	Не найдено				1cgo 1fjm	25 15		1b38	50
3. Asp		5acn 2adm	30 131		3lzm 1lts 2cpp	76 151 240		2ak3	71
4. Asp	Не найдено				1ffv	11		1c7s 1apx	359 79
5. Asp	Не найдено				2rn2	138	Не найдено		
6. Glu		1lh4 2aru 1m7e	116 64 181	Не найдено			Не найдено		
7. Glu		1rnl 3pmg	118 439	Не найдено				1iag	84

Таблица 9.15 (*продолжение*)

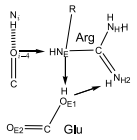
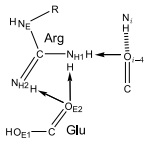
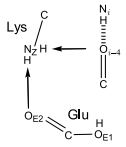
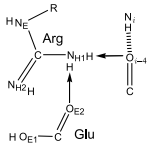
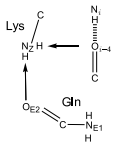
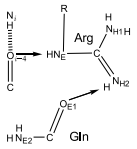
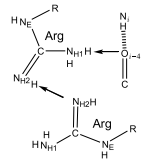
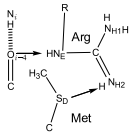
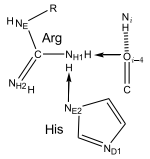
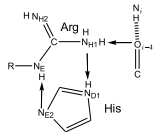
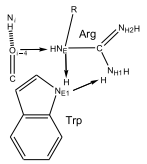
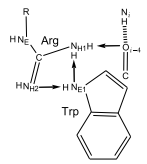
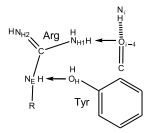
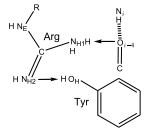
АК $i-4$	Н-связь Lys NZ–O_{i-4}	Файл PDB	i-я АК	Н-связь Arg NE–O_{i-4}	Файл PDB	i-я АК	Н-связь Arg NH1–O_{i-4}	Файл PDB	i-я АК
8. Glu	Не найдено				1tf4	86		2cpp 1a5z	377 242
9. Glu		1cme	312	Не найдено				1nsy	8
10. Gln		1gzm	248		2cgp 1vin	123 400	Не найдено		
11. Arg	Не найдено			Не найдено				4crx	301
12. Met	Не найдено				1ecl	310	Не найдено		
13. His	Не найдено			Не найдено				1gdo	108
14. His	Не найдено			Не найдено				1euc	121

Таблица 9.15 (*окончание*)

АК $i-4$	H-связь Lys NZ–O_{i-4}	Файл PDB	i-я АК	H-связь Arg NE–O_{i-4}	Файл PDB	i-я АК	H-связь Arg NH1–O_{i-4}	Файл PDB	i-я АК
15. Trp	Не найдено				1req	418		1qht	346
16. Tyr	Не найдено			Не найдено				1epx	109
17. Tyr	Не найдено			Не найдено				1c7s	439

входов и выходов СФУ и их систематизация может послужить следующим этапом в установлении функциональных свойств боковых цепей аминокислот как модулей ССИВС.

В то же время, необходимо отметить, что проведенный выше анализ СФУ выявил два момента, которые отразили табл. 9.13–9.15.

1. Не все мыслимые сочетания полярных аминокислот, занимающих в i-е и $(i-4)$-е положения, образуют СФУ. Чаще всего (хотя и не с абсолютной точностью) такие сочетания не образуются между одинаковыми боковыми цепями, а также расположенными по разные стороны квази-зеркальной плоскости симметрии нашей модели структуры канонического набора аминокислот (см. рис. 8.30). Например, не выявлены СФУ для сочетаний His–His, Trp–Trp, Tyr–Tyr, Ser–Ser, The–Thr, Lys–Lys, Asp–Asp, а His–Trp, His–Tyr, Lys–Arg, Thr–Ser, Met–Cys. Очень редко образуют СФУ Asp–Glu, хотя в этих положениях они встречаются относительно часто.

2. Наличие в i-м и $(i-4)$-м положениях аминокислот, способных к образованию СФУ, еще не означает, что они обязательно должны также образоваться. Например, для сочетаний Asp–Lys, Asp–Gln они найдены примерно в половине всех циклов, а для Asp–Arg — лишь в 30 % случаев.

Последнее обстоятельство заставило нас задуматься о причинах этого. Для выяснения возможных причин мы обратились к более детальному анализу наиболее распространенных сочетаний Asp–Lys.

9.2.4.3. ***Причины, препятствующие образованию структурно-функциональных узлов в сочетаниях Asp–Lys.*** Мы проанализировали 135 4-х-звенных циклов, содержащих в i-м–$(i-4)$-м положениях сочетания Asp–Lys, из которых лишь 71

цикл (52,6 %) образуют СФУ. В процессе анализа выявилось ряд групп, в которых, по-видимому, имеется сходная причина, по которой СФУ не образуются.

1. Несколько белков, представляющих собой димеры, содержали СФУ, но в одной из субъединиц. В белке монеллине (1mol) в субъединице B имеется СФУ между Asp 21 и Lys 17, в то время как в субъединице A-связь Lys 17 с Asp 21 отсутствовала. Аналогичная особенность наблюдалась для энтеротоксина стафилококков (1esf): в субъединице B Lys 74 образует СФУ с Asp 78, а в субъединице A — с Gln 49; в фосфоглюкомутазе мышц кролика (3pmg), где в субъединице B имеется СФУ между Lys 439 и Asp 443, а в субъединице A Lys 439 образует связь с Glu 435. В гемоглобине, который является функциональным димером, в субединице C Lys 60 образует СФУ с Asp 64, а аналогичной по аминокислотной последовательности субъединице A Lys 60 находится в свободном состоянии. В алкогольдегидрогеназе трески (1cdo) Lys 333 в субъединице B образует СФУ с Asp 337, а в субъединице A — связан водородной связью с Asp 162, а в аналогичном ферменте лошади (1hld) Lys 330 в субъединице B образует СФУ с Asp 334, а в субъединице A — свободен. Количество таких примеров можно приумножить. Все они показывают, что образование СФУ носит динамический характер и, в зависимости от функционального состояния субъединиц, может либо существовать, либо размыкаться (механизм по принципу флип-флопа). Эта группа примеров указывает на принципиальную важность исследования нативного, функционального состояния белка. Если в естественном состоянии белок является димером, а исследован мономер, то нельзя исключить, что отсутствие СФУ связано с фиксацией одного из состояний белка, в котором СФУ не существует.

2. Другая группа примеров отсутствия СФУ обусловлена совсем иными причинами. Например, в руброритине микроорганизмов (1ryt) Lys 133 участвует в образовании ССИВС с Tyr 98–Glu 132–His 95–Thr 99 до появления 4-х-звенного цикла Asp 137. В эндоцеллюлазе микроорганизмов (1tf4) Lys 279 образует водородную связь с Asp 241 и не образует СФУ с Asp 283. В цитохром-C-пероксидазе дрожжей (1bes) C–N-группа Lys 268 образует H-связь с Glu 167, но не образует СФУ с Asp 272, хотя обе аминокислоты находятся на спиральном участке. В легкой цепи белка кальпактина (1a4p) Lys 53 образует водородную связь с Asp 47, но не образует СФУ с Asp 57. Хотя, таких примеров в нашей выборке оказалось не так уж много, они показывают, что если в паре i–$(i-4)$, потенциально способной к образованию СФУ, $(i-4)$-я аминокислота взаимодействует с боковой цепью уже ранее сформированной структуры, то возможность образования СФУ с последующей структурой не может быть реализована. Это свидетельствует о существенной значимости ко-трансляционного механизма сворачивания белка, в результате которого ранее сформированная структура оказывает определенное влияние на возможности сворачивания вновь синтезированных фрагментов структуры. Данный факт можно использовать при конструировании структур с заранее заданными свойствами, что будет показано в следующем разделе.

3. Около двадцати белков, в которых отсутствовали СФУ, были объединены в группу на основе одного признака: аминокислота Lys находилась на границе перехода двух структур — растянутой, обычно β-структуры, и спиральной, обычно α-спирали. Примерами таких белков являются ядерный антиген пролиферирующих клеток дрожжей (1plq — Lys 210, Lys 146), ферредоксин редуктаза шпината (1fnb–Lys 279), миогенмэритрин червя (2mhr–Lys 75), бактериальная хитиназа (1ctn–Lys 287) и еще ряд других. Если знать, как формируется β-структура и α-спираль, то знание этой

особенности Lys на границе перехода двух структур также может быть использовано для направленного их конструирования.

4. Было найдено также ряд структур (порядка десяти), в которых обе аминокислоты пары i–$(i-4)$ расположены на α-спирали, но тем не менее, без видимых причин СФУ между ними не образуется. Примерами являются фрагменты леггемоглобина люпина (1lh4–Lys 147), активирующий белок микроорганизмов (2cgp–Lys 188), енолаза дрожжей (4enl–Lys 357) и ряд других. Не исключено, однако, что по крайне мере в части из них мы имеем дело белками, которые на самом деле являются димерами и отсутствие СФУ обусловлено фиксацией того состояниея белка, в котором СФУ разомкнуто. Однако возможно, что в процессе поиска будут найдены и иные объяснения приведенных фактов.

Таким образом, анализ сочетаний Asp–Lys показывает, что имеются различные причины, в первую очередь связанные поочередностью работы субъединиц и котрансляционным механизмом самоорганизации белка, которые влияют на формирование СФУ в этих сочетаниях. Аналогичные закономерности формирования СФУ можно проследить и для других сочетаний. Используя эту же модель, мы предприняли попытку конструирования СФУ на основе ряда известных свойств аминокислот.

9.2.4.4. ***Конструирование коротких фрагментов белка с запрограммированным формированием структурно-функциональных узлов.*** Рассмотрим цепь аминокислот, показанную на рис. 9.6, *а*. Предположим, что данная последовательность из 12 аминокислот содержит в i-м и $(i-8)$-м положениях Asp, а в $(i-4)$-м — Lys, причем остальные аминокислоты благоприятствуют формированию α-спирали и не содержат в $(i-1)$-м, $(i-5)$-м положениях Pro, который как мы видели, в 4-х-звенных циклах обычно не встречается. Как можно влиять на формирование СФУ в такой цепи.

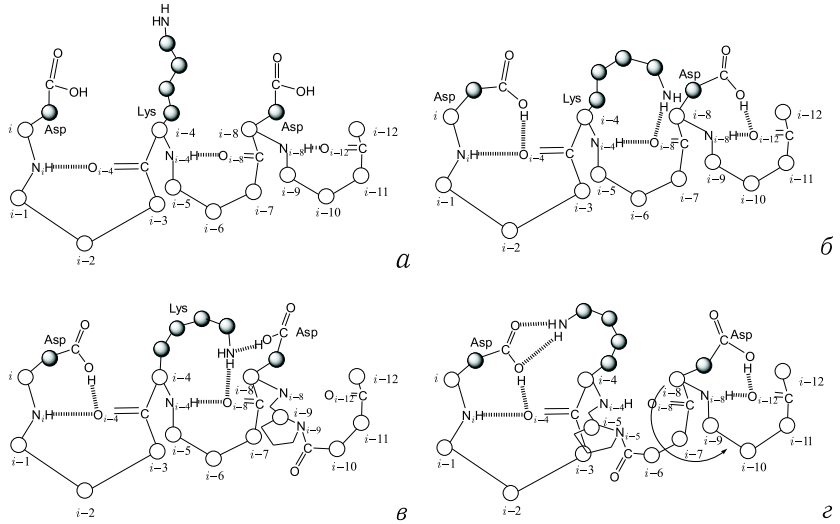


Рис. 9.6. Пример конструирования фрагмента полипептидной цепи с программируемым образованием структурно-функциональных блоков

1. Предположим, что в $(i-9)$-м положении также отсутствует Pro. Тогда ситуация будет выглядеть так, как показано на рис. 9,4, *б*. При последовательном синтезе и ко-трансляционном сворачивании этого фрагмента все три аминокислоты образуют 4-х-звенные циклы. Первым возникает цикл для Asp $i-8$, затем для Lys $i-4$ и, в конце, для Asp i. Весь фрагмент будет выглядеть как α-спираль.

2. Введем теперь в положение $i-9$ аминокислоту Pro (рис. 8.4 *в*). Ее появление на $i-9$ стадии приведет к тому, что цикл с участием Asp $i-8$ не сможет образоваться. В этом случае образование цикла с Lys $i-4$ может сопровождаться формированием СФУ между Lys $i-4$ и Asp $i-8$. При этом на образование цикла Asp i это никак не влияет. Спиральным будет участок цепи от $i-8$-го до i-го.

3. Если теперь ввести Pro в положение $i-5$, то это воспрепятствует образованию цикла с участием Lys $i-4$, который, будучи свободным, будет взаимодействовать с циклом Asp i с образованием СФУ. Спиральный фрагмент распадется на две части — правую, с участием Asp $i-8$ и левую, содержащем СФУ Lys $(i-4)$–Asp i.

Таким образом, изменяя положение аминокислоты Pro, мы в состоянии вызвать или не допустить образование СФУ — структуры более высокого порядка, чем просто спираль.

9.2.4.5. ***Перспективы развития конструирования структурно-функциональных узлов.*** Изложенные в данном разделе идеи являются лишь первым шагом на пути конструирования функциональных структур. Принципиально важным в развитии этого направления является учет ко-трансляционного механизма самоорганизации белка. Впервые о необходимости этого высказывался в своих работах Л. Б. Меклер [16], однако в последние годы эти идеи приобрели и экспериментальную поддержку [17].

Проводившийся на ранних этапах исследования структуры белков анализ статистических закономерностей расположения боковых цепей аминокислот в белках [18–24], к сожалению, не привел к получению точных алгоритмов предсказания вторичной структуры белков. С нашей точки зрения это можно понять, если принять во внимание то, что полипептидная цепь состоит не из боковых цепей, расположенных случайным образом, а из операторов связности и антисвязности, работа которых подчиняется логике. Например, если на $(i-1)$-м этапе произошло событие 1, то на i-м этапе произойдет событие 2, а если на $(i-1)$-м этапе произошло событие 3, то на i-м этапе событие 2 уже не может произойти, а осуществится событие 4.

Эта идея может быть распространена не только на взаимодействия ближнего порядка, что вполне логично, но и на дальние взаимодействия. При этом выявляется существенное влияние уже сформированной структуры на процесс формирования вновь синтезируемой. С этих позиций легко интерпретируются данные, приведенные в разделе 9.2.3.3, пункт 2, согласно которым боковая цепь Lys образует водородную связь с боковыми цепями аминокислот (Asp, Glu), находящимися в сформированной структуре. Они уже заняли свое положение, «поджидая» появление боковой цепи Lys. Как только она появляется, происходит образование водородной связи C–NH… …O=C–OH, при этом появляющаяся через четыре аминокислоты боковая цепь Asp уже не сможет образовать H-связь с $(i-4)$-й боковой цепью Lys и СФУ БП не образуется.

В этой связи становится понятным, почему одна и та же последовательность аминокислот (мы с этими фактами встречались неоднократно) в одних случаях является

спиральной, а в другом случае — фрагментом b-структуры. Приведенный только что пример показывает, что это может быть обусловлено действием предшествующей структуры.

В процессе проведенного анализа мы акцентировали внимание лишь на двух возможностях действия физических операторов: формирование 4-х-звенного цикла и образование СФУ этого цикла с $(i-4)$-й боковой цепью. Мы предполагаем, что помимо влияния предшествующей структуры, их образование зависит от структуры и последовательности расположения боковых цепей, входящих в состав 4-х-звенного цикла. Последнее обстоятельство проявляется в том, что помимо описанных выше взаимодействий возникают и другие связи боковых цепей, которые необходимо учитывать. Например, мы совершенно не рассматривали возможности образования ССИВС между боковыми цепями аминокислот, занимающими i–$(i-4)$-е, i–$(i-3)$-е, i–$(i-2)$-е положения. Для их образования на спиральных фрагментах (запрет или предпочтение на какие-либо аминокислоты, находящиеся между этими положениями), вероятно, также существуют определенные условия и ограничения. После соответствующей разработки, эти закономерности можно учесть в процессе построения реальных структур.

Литература к главе 9

1. *Карасев В.А.* Архитектура, принципы организации и функционирования биоорганических наноструктур // В кн. Нанотехнология. Физика, процессы, диагностика, приборы / Ред. В.В. Лучинин и Ю.М. Таиров. — М.: Физматлит, 2006. С. 65–97.
2. *Карасев В.А.* Аминокислоты канонического набора как неприводимые представления группы векторов — диаметров додекаэдра // Депонировано ВИНИТИ. 2007. № 461-В2007. — 29 с.
3. *Karasev V.A.*, *Luchinin V.V.*, *Stefanov V.E.* A model of the «molecular vector machine» for protein folding // In: Proceedings of the 3-rd Moscow conference on computational molecular biology. Moscow, Russia, July 27–31, 2007. P. 134–136.
4. *Karasev V.A.*, *Demchenko E.L.*, *Stefanov V.E.* Topological coding of polymers and protein structure prediction // In: Chemical topology: applications and techniques / Ed. by D. Bonchev, D. Rouvray. — Ser. Math. Chem. 2000. V. 6. P. 295–345. — Gordon & Breach, N.Y.–London–Paris.
5. Cars*ana A., Confalone E., Palmieri M., Libonati M., Furia A*. Structure of the bovine pancreatic ribonuclease gene: the unique intervening sequence in the 5' untranslated region contains a promoter-like element // Nucleic Acids Res. 1988. V. 16. P. 5491–5502.
6. *Wlodaver A.*, *Svensson L.A.*, *Sjolin L.*, *Gilliland G.L.* Structure of phosphate-free ribonuclese A // Biochemistry. 1988. V. 27. P. 2705–2712.
7. *Cato A.C.B.*, *Geisse S.*, *Wenz M.*, *Westphal H.M.*, *Beato M.* The nucleotide sequences recognized by the glucocorticoid receptor in the rabbit uteroglobin gene region are located far upstream from the initiation of transcription // EMBO J. 1984. V. 3. P. 2771–2778.
8. *Morize I.*, *Surcouf E.*, *Vaney M.C.*, *Epelboin Y.*, *Buehner M.*, *Fridlansky F.*, *Milgrom E.*, *Mornon J.P.* Refinement of the C. 222-1 crystal form of oxidized uteroglobin at 1.34 Å resolution // J. Mol. Biol. 1987. V. 194. P. 725–732.
9. *Stapley B.J.*, *Doig A.J.* Hydrogen bonding interactions between glutamine and asparagine in alpha-helical peptides // J. Mol. Biol. 1997. V. 272. P. 465–473.
10. *Armstrong K.M.*, *Baldwin R.L.* Charged histidine affects alpha-helix stability at all positions in the helix by interacting with the backbone charges // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1993. V. 90. P. 11337–11340.
11. *Mitchell J.B.*, *Thornton J.M.*, *Singh J.*, *Price S.L.* Towards an understanding of the arginine-aspartate interaction // J. Mol. Biol. 1992. V. 226. P. 251–262.
12. *Serrano L.*, *Bycroft M.*, *Fersht A.R.* Aromatic-aromatic interactions and protein stability. Investigation by double-mutant cycles // J. Mol. Biol. 1991. V. 218. P. 465–475.
13. *Serrano L.*, *Fersht A.R.* Capping and alpha-helix stability // Nature. 1989. V. 342. P. 296–299.
14. *Sali D.*, *Bycroft M.*, *Fersht A.R.* Stabilization of protein structure by interaction of alpha-helix dipole with a charged side chain // Nature. 1988. V. 335. P. 740–743.
15. 15.*Richardson J.S., Richardson D.C.* Amino acid preferences for specific locations at the ends of alpha helices // Science. 1988. V. 240. P. 1648–1652.
16. *Bashford D.*, *Chothia C.*, *Lesk A.M.* Determinants of a protein fold. Unique features of the globin amino acid sequences // J. Mol. Biol. 1987. V. 196. P. 199–216.
17. *Marqusee S.*, *Baldwin R.L.* Helix stabilization by Glu-...Lys+ salt bridges in short peptides of de novo design // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1987. V. 84. P. 8898–8902.

18. *Sundaralingam M.*, *Sekharudu Y.C.*, *Yathindra N.*, *Ravichandran V.* Ion pairs in alpha helices // Proteins. 1987. V. 2. P. 64–71.
19. *Меклер Л.Б.*, *Идлис Р.Г.* Общий стереохимический генетический код — путь к биологии и универсальной медицине XXI века // Природа. 1993. № 5. С. 29–63.
20. *Kolb V.A.*, *Makeyev E.V.*, *Spirin A.S.* Co-translational folding of an eukaryotic multidomain protein in a prokaryotic translation system // J. Biol Chem. 2000. V. 275. P. 16597–16601.
21. *Chou P.Y.*, *Fasman G.D.* Prediction of protein conformation // Biochemistry. 1974. V. 13. P. 222–245.
22. *Beghin F.* Dirks J.Une methode statistique simple de prediction des conformations proteiques // Arch. Int. Physiol. Biochem. 1975. V. 83. P. 167–168.
23. *Periti P.F.* Bayesian approach to the recognition of discrete patterns with an applications to a problem of protein molecular structure // Bull. Chim. Pharm. 1974. V. 113. P. 187–218.
24. *Garnier J.*, *Osguthorpe D.J.*, *Robson B.* Analysis of the accuracy and implications of simple methods for predicting the secondary structure of globular proteins // J. Mol. Biol. 1978. V. 120. P. 97–120.

Глава 10

ОЛИГОМЕРНЫЕ КАТАЛИЗАТОРЫ КАК МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ПРОЦЕССОРЫ

В шестой главе с позиции концепции ССИВС были рассмотрены базовая архитектура и базовые элементы надмолекулярных структур. Естественно, что эти две составляющие интересны не сами по себе, а как основа для построения молекулярных устройств. Одним из простейших устройств подобного рода может служить молекулярный процессор, способный осуществлять ряд развернутых во времени операций, приводящих к переходу объекта воздействия из одного состояния в другое. Эти операции должны проводиться за счет использование энергии распада молекул, либо специально предназначенных для роли доноров заряда, либо являющихся объектом воздействия процессора. На молекулярном уровне таким процессором может быть надмолекулярная структура, способная осуществлять химические превращения одной молекулы (субстрата) в другую молекулу (продукт), проще говоря, служить катализатором. Структура такого процессора должна оставаться постоянной. При этом, однако, он может изменяться во время производимого им действия.

В этой главе мы рассмотрим общую схему молекулярного катализа при участии ССИВС, а также проиллюстрируем возможность существования подобного механизма молекулярного катализа на примере ферментов, катализаторов биологического происхождения.

10.1. Модель молекулярного катализа на основе ССИВС

10.1.1. Принцип обратной связи как механизм катализа при участии ССИВС. В надмолекулярной структуре, осуществляющей процесс катализа можно выделить два участка (рис. 10.1). Первый из них является активным центром, в котором происходит преобразование субстрата в продукт (обозначен цифрой *1*) и находятся входы и выходы ССИВС из структуры. Второй участок — это ССИВС

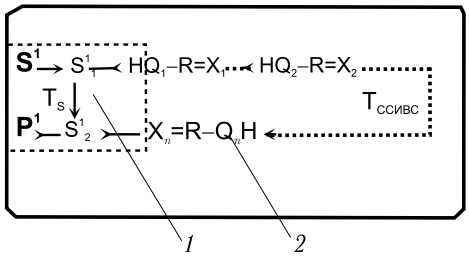


Рис. 10.1. Элементы структуры молекулярного процессора, осуществляющего катализ: *1* — область активного центра; *2* — системы сопряженных ионно-водородных связей внутри структуры

внутри структуры, которые обеспечивают перенос зарядов в процессе каталитического акта [1, 2]. Конструкция ССИВС является «памятью» надмолекулярной структуры, благодаря которой в ней возможно осуществление того или иного конкретного каталитического процесса.

Центральной идеей модели катализа при участии ССИВС [3] является допущение о том, что при взаимодействии субстрата с какой-либо ССИВС, расположенной в структуре катализатора образуется комплекс, свободная энергия которого (F_{ES}) меньше суммы энергий субстрата (F_S) и ССИВС катализатора (F_E), взятых по отдельности (схема 10.1):

$$F_{ES} < F_S + F_E. \tag{10.1}$$

В результате образования такого катализатор-субстратного комплекса (КСК) будет выделяться избыточная свободная энергия (схема 10.2)

$$F_R = (F_S + F_E) - F_{ES}. \tag{10.2}$$

Эта энергия, в принципе, может рассеиваться, но может и использоваться ССИВС катализатора для снижения потенциальных барьеров катализируемой реакции. Такое полезное использование свободной энергии в биокатализе обычно называют рекуперацией [4].

Для того, чтобы переносимая по ССИВС энергия могла использоваться в субстратом для перехода из одной стадии в другую необходимо, чтобы ССИВС имела в области активного центра как вход для появляющегося при образовании КСК избыточного заряда, так и выход для этого заряда обратно к субстрату, перешедшему в следующую промежуточную стадию $S^1{}_1 \rightarrow S^1{}_2$ (рис. 10.1). Иными словами, ССИВС должна формировать петлю обратной связи.

10.1.2. Синхронизация переноса зарядов по ССИВС со стадиями превращения субстрата. Наличие петли обратной связи само по себе является необходимым, но недостаточным условием эффективной рекуперации свободной энергии. В процессе прохождения заряда (будем далее использовать термин «сигнал») возможны следующие варианты:

— сигнал подошел к субстрату раньше, чем тот перешел в следующее состояние: $T_s > T_{ССИВС}$;

— сигнал появился позже, чем, чем субстрат перешел в следующее состояние и субстрат уже успел растерять часть своей внутренней энергии, необходимой для перехода в следующую стадию: $T_s < T_{ССИВС}$;

— время прохождения сигнала по ССИВС равно времени перехода субстрата в следующую стадию: $T_s = T_{ССИВС}$.

В последнем случае энергия сигнала используется наиболее эффективно, поскольку процесс прохождения сигнала по ССИВС синхронизован со стадией состояния субстрата. Энергия сигнала обеспечивает при этом снижение энергетического барьера для перехода субстрата в следующее состояние и переводит его в это состояние, например в продукт P (рис. 10.1).

Синхронизацию процесса прохождения сигнала по ССИВС со стадиями катализа можно обеспечить:

— определенной протяженностью ССИВС;

— включением в ССИВС элементов инверсии (сигнал должен пройти путь до элемента инверсии и обратно), что увеличивает время прохождения сигнала;

— включением в ССИВС элементов задержки сигнала, что также замедляет движение последнего по ССИВС.

В пятой главе мы рассмотрели все эти возможности для ряда боковых цепей аминокислот (Trp, Tyr, His), но без конкретного их приложения. В описанной модели катализа, примененной к биоструктурам, эти элементы могут быть использованы при конструировании ферментов, биологических молекулярных процессоров. Естественно, что если речь будет идти о других типах групп, обеспечивающих связность основной цепи цепных полимеров (см. табл. 6.2), то система боковых цепей для элементов задержки и инверсии может быть существенно иной, не похожей известные нам аминокислоты.

10.1.3. Аллостерическая регуляция процесса катализа. Предположим, что одна из групп в ССИВС (Q_i–R=X_i) принадлежит не самой структуре, а какой-либо молекуле 1, не претерпевающей в процессе катализа химических превращений (рис. 10.2, *а*). При этом область, где должна быть расположена ССИВС, находится на удаленном от активного центра расстоянии. Тогда в присутствии этой молекулы, когда ССИВС является целостной, катализ будет происходить. В случае же когда молекула 1 отсутствует, ССИВС оказывается разомкнутой (рис. 10.2, *б*) и процесс катализа при участии ССИВС оказывается невозможным. В этом случае молекула 1 выполняет роль пространственно удаленного регулятора (в биохимии используют термин аллостерический регулятор). На рис. 10.2 этот регулятор выполняет активирующую роль, т. е. является активатором. В тоже время, можно представить такой вариант, когда регулятор замыкает ССИВС, отводящую сигнал от активного центра. Тогда а в его присутствии катализ подавлен (ингибирован), тогда как в отсутствие регулятора катализатор будет активным. Регулятор такого типа является ингибитором.

Таким образом, суть аллостерической регуляции катализа при участии ССИВС состоит в их замыкании группами, принадлежащими молекулам, не входящими в структуру катализатора и не претерпевающими в ходе катализа каких-либо химических превращений.

Следует отметить, что аналогичный механизм с участием ССИВС может лежать в основе процессов молекулярного узнавания, т. е. рецепции или сенсорики, что будет рассмотрено в дальнейшем (гл. 12).

10.1.4. Реализация механизма переноса зарядов по ССИВС. Согласно модели (раздел 5.2.), процесс переноса зарядов по ССИВС происходит путем перемещения отрицательного заряда от донора к акцептору, встречного кооперативного сдвига протонов и перемещением двойных связей в сторону от протонов. Этот процесс в одном направлении может происходить лишь однократно. Для того, чтобы процесс был циклическим, необходима его термодинамическая обратимость (раздел 5.2.4.), которая обеспечивается тождественностью доноров (D^1=D^2) и акцепторов (A^1=A^2), участвующих в отдаче и получении зарядов в прямом и обратном направлениях, а также симметрией донорного и акцепторного участков ССИВС.

Для того, чтобы модель катализа удовлетворяла условию термодинамической обратимости необходимо, чтобы помимо промежуточных акцепторов заряда существовал бы и конечный акцептор, который бы осуществил обращение процесса переноса заряда. Этим акцептором не может быть продукт P^1, поскольку с его уходом бы терялась вся энергия, запасенная структурой катализатора, но может быть вторая

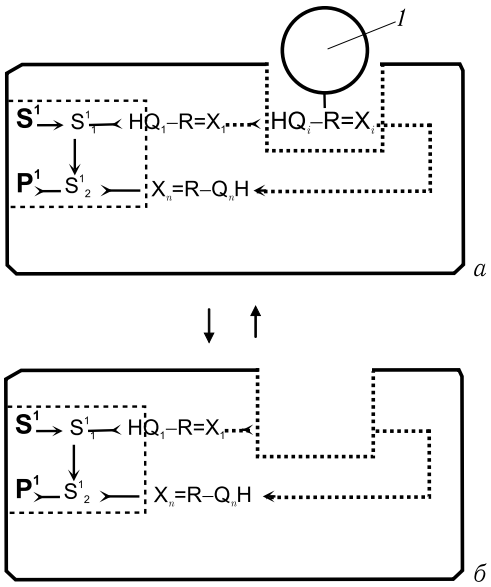


Рис. 10.2. Модель аллостерической регуляции катализа при участии ССИВС: *а* — аллостерический регулятор (обозначен цифрой *1*) в структуре ССИВС; *б* — аллостерический регулятор отсутствует

молекула субстрата (S^2), находящаяся во второй, симметричной первой, субъединице (рис. 10.3.). На практике это означает, что согласно модели должна существовать ССИВС, соединяющая активные центры двух субъединиц. Для процесса катализа необходимо формирование петли обратной связи и желательно наличие регуляторного центра. Молекула S^2 может на этапе катализа в первом активном центре выполнять во втором активном центре роль аллостерического регулятора в петле обратной связи (на рис. 10.3, *а* — это ССИВС, идущая от S_1^1 через $HQ_1{-}R{=}X_1 \ldots HQ_2{-}R{=}X_2$ к S^2 и далее к S_2^1). По завершении катализа эта же молекула S^2 может выступать в качестве конечного акцептора заряда. При этом сигнал из структуры будет инициировать процесс катализа во втором активном центре (рис. 10.3, *б*), в то время как в первом активном центре продукт реакции P заменяется на новую молекулу субстрата (S^1), которая становится регулятором. Далее процесс повторяется, но роль активных центров в субъединицах меняется местами. Обращаем внимание на то, что на рис. 10.3, *а* все атомы водорода в структуре находятся с левой стороны от групп (например, $HQ_1{-}R{=}X_1$), что ведет к переносу заряда от S^1 к S^2. В то же время, на рис. 10.3, *б* они находятся с правой стороны (например, $X_1{=}R{-}Q_1H$), что должно приводить к переносу заряда от S^2 к S^1. Таким образом, учет термодинамической обратимости процесса переноса заряда по ССИВС приводит к построению модели катализатора, состоящего из двух субъединиц, в котором активные центры поочередно функционируют в роли каталитического и регуляторного центров.

В рамках данной модели процессор функционирует как молекулярный мультивибратор, состоящий как минимум, из двух симметричных субъединиц, находящихся попеременно в двух состояниях. Как мы покажем далее, такой колебательный режим

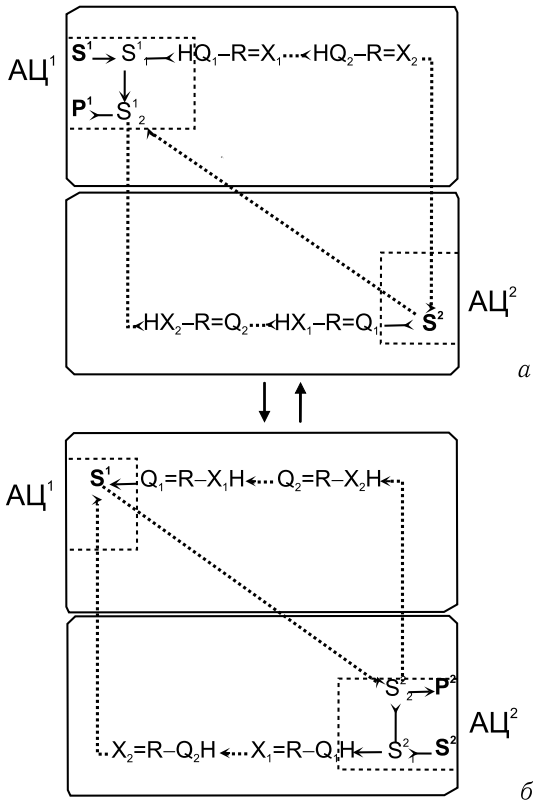


Рис. 10.3. Реализация механизма переноса зарядов по ССИВС в модели катализа

работы («флип-флоп») довольно часто встречается среди биокатализаторов и является, вероятно, универсальным [2, 3].

10.1.5. Динамический вариант модели биокатализа. Процесс переноса заряда, очевидно, сопровождается усилением ион-дипольных взаимодействий в ССИВС и должен приводить к синхронному изменению конформации надмолекулярного катализатора. На рис. 10.4 показана возможная динамика структурных перестроек в области контакта субъединиц надмолекулярного катализатора.

Процесс происходит в четыре стадии, аналогично схемам 5.33–5.39. Перенос зарядов в направлении слева направо (рис. 10.4, *а*, *б*) сопровождается кооперативным сдвигом протонов, разрывом старых связей и образованием новых. Процесс заканчивается приходом отрицательного заряда к акцептору и захватом протона акцептором из среды. Аналогичные этапы проходит перенос зарядов справа налево (рис. 10.4, *в*, *г*), после замены молекулы акцептора на новую молекулу донора, а молекулы донора на новую молекулу акцептора.

Как видно на рис. 10.4, наиболее благоприятными для конформационных переходов субъединиц с участием ССИВС является растянутые конформации обоих цепных полимеров, участвующих в контакте.

Описанный механизм можно использовать для целей изменения размеров активного центра, что сможет обеспечить спонтанную смену субстратов и продуктов ката-

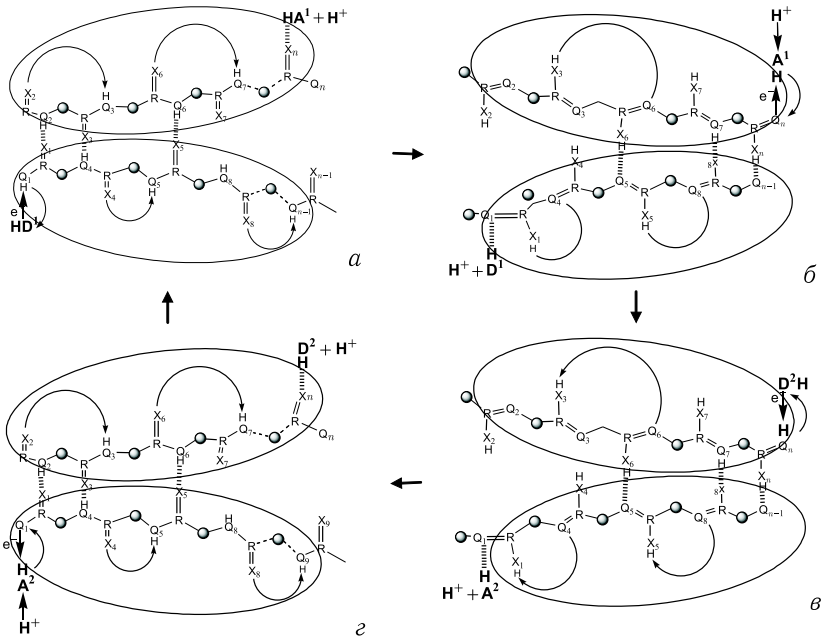


Рис. 10.4. Динамика структурных перестроек в области контакта субъединиц катализатора

литической реакции. Предложенный на его основе динамический вариант катализа олигомерными структурами показан на рис. 10.5.

На стадии *а* сигнал, проходя по ССИВС, обеспечивает синхронизацию переноса заряда со стадиями превращения субстрата в ходе каталитического акта (рис. 10.5, *а*). Вторая молекула субстрата (S^2) участвует в этом процессе в роли замыкателя ССИВС, не претерпевающего химических превращений (аллостерического регулятора). В области контакта субъединиц перенос заряда обеспечивает сближение ранее отдаленных групп, с последующим формированием непрерывных ССИВС. При этом происходит изменение конформации структуры, что на стадии *б* (рис. 10.5, *а*) приводит к открыванию первого активного центра, выходу продукта P^1 и закрытию второго активного центра с молекулой субстрата S^2. На этой стадии сигнал передается молекуле S^2 и образуется $КСК^2$. Далее происходит переключение активности и аналогичный процесс катализа идет во втором активном центре (рис. 10.5, *в*, *г*), а первая субъединица выполняет регуляторные функции. При этом все этапы катализа полностью идентичны первому активному центру и неотличимы от него.

В динамическом варианте наиболее полно отразились все элементы модели катализа. Структуру, реализующую эту модель, и обладающую свойствами попеременного переключения функциональной активности, которую можно рассматривать как молекулярный мультивибратор. Результатом ее работы является последовательное осуществление молекулярных операций по превращению субстрата в продукт, поэтому данная структура будет обладать также свойствами микропроцессора. При этом ССИВС в нашей модели обеспечивают индукцию изменений конформации структур при образовании КСК, синхронизацию изменений конформации структур со стадиями превращения субстрата, открытие активного центра для замены готового

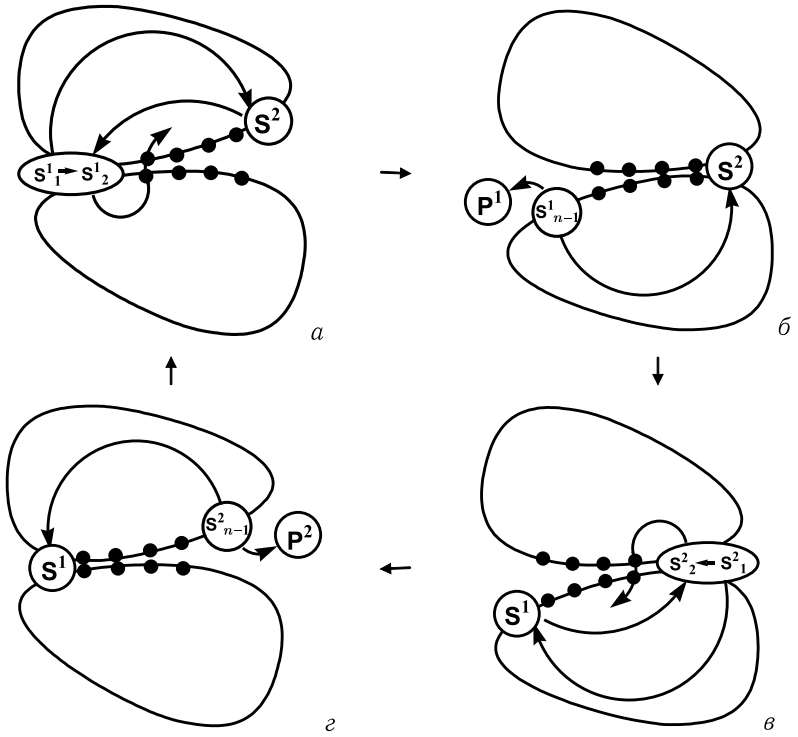


Рис. 10.5. Динамический вариант катализа олигомерными структурами

продукта на новую молекулу субстрата, образование нового КСК и симметричную инициацию процесса катализа в другой субъединице.

Предложенная модель является универсальной по отношению к типу цепных полимеров, формирующих надмолекулярную структуру (см. раздел 6.1.5). Однако, поскольку реально нам известны цепные полимеры на основе пептидных звеньев (белки), т. е. содержащие системы HN–C=O-групп, то далее мы будем сопоставлять нашу модель с теми данными, которые известны для биокатализаторов (ферментов).

В свое время, в работе [5] была высказана мысль о том, что всякая новая концепция ферментативного катализа должна включать старые теории в качестве частных случаев, что можно отнести и к другим новым обобщениям. По этой причине необходимо хотя бы кратко, изложить основы тех представлений о биокатализе, которые сложились в процессе исследования ферментов, с тем, чтобы оценить, какие из элементов нашей модели являются традиционными, а какие — новыми.

10.2. Развитие представлений о сущности ферментативного катализа

Как и в предыдущих главах, обзор литературы о механизмах биокатализа в первых его разделах будет включать в себя литературу, традиционно рассматриваемую при обсуждении этого вопроса. В значительной степени они воспроизводят материал, изложенный в монографии [3]. При этом будут изложены в основном идеи, а де-

тальное обсуждение данных, которые их поддерживают, мы, как правило, опускаем. В конце раздела мы сопоставим нашу модель с существующими концепциями катализа.

10.2.1. Общие концепции. Считается, что одним из первых, кто наиболее четко сформулировал представления о природе взаимодействия субстрата с ферментом, явился Э. Фишер [6]. Он предположил, что субстрат соответствует структуре фермента, как ключ — замку. В дальнейшем, по мере углубления в проблему, эта концепция уступила идее комплементарности фермента переходному состоянию субстрата [7, 8]. Идея «ключа и замка», предполагает жесткое стереохимическое соответствие субстрата и активного центра. В отличие от нее, подходы [7, 8] допускают, что при связывании с ферментом в субстрате происходят такие изменения конформации, которые подготавливают его превращения на последующих стадиях катализа. Идея деформации структуры субстрата на ферменте получила последовательное развитие в работах [9, 10]. Роль фермента в понижении энергии активации ферментативной реакции состоит, согласно [10], в предоставлении им групп, вызывающих перераспределение электронной плотности в субстрате, его деформацию и растяжение по одной из связей, что приводит к образованию продукта («концепция дыбы»). В рамках этой концепции ферменту отводится роль носителя активных групп при связывании субстрата, выполняющих, функции обобщенных кислот и оснований [11].

Другой группой подходов к проблеме ферментативного катализа, также отталкивающиеся от идеи «ключ–замок», являются представления об активной роли фермента в каталитическом процессе. Согласно Кошланду [12, 13], субстрат индуцирует в ферменте такие конформационные изменения, которые приводят к образованию структурного соответствия фермента и субстрата («теория индуцированного соответствия»). Иными словами, соответствие субстрата и фермента существует не изначально, а возникает в процессе катализа на определенных стадиях. Связывание субстрата и определенная ориентация перестраиваемых электронных оболочек должна приводить к снижению энергетического барьера реакции в фермент-субстратном комплексе.

Развитием идеи конформационных перестроек является концепция электронно-конформационных взаимодействий (ЭКВ-концепция), предложенная М. В. Волькенштейном [14]. В работе [15] на основе этой концепции было предложено простое объяснение сущности ферментативного катализа. При этом была использована модель взаимодействия электронов и атомных ядер в потенциальном ящике с высокими стенками. Предполагается, что в случае параболической формы этого ящика электроны как бы расширяют своим давлением стенки этого ящика-параболы. Точка пересечения со второй параболой, отвечающей конечному состоянию фермент-субстратного комплекса, перемещается и ее ордината, представляющая собой энергию активации, понижается. Смысл ЭКВ, согласно [5, 16], состоит в том, что электронная перестройка в активном центре влечет за собой изменение конформации всего фермент-субстратного комплекса. В конечном счете, изменение поверхностей потенциальной энергии и приводит к эффективному ускорению ферментативной реакции. В работах [17, 18] рассматривается релаксация фермента по «пути с выделенной степенью свободы», также примыкающая к идее конформационной лабильности ферментов в процессе катализа. Одним из аспектов механизма биоткатализа является также

анализ эффектов, связанных с заменой полярной среды, окружающей субстрат, на неполярную среду фермента [19]. При этом конформационные переходы могут обеспечить ту среду, которая наиболее благоприятна для той или иной стадии ферментативной реакции.

Введенное в работе [20] понятие конформона как элементарного акта, связанного с изменением конформации белка, долгие годы практически не применявшееся, нашло неожиданное продолжение в работе [21]. Автор считает, что конформоны могут лежать в основе многих бионергетических процессов, в том числе и биокатализа.

10.2.2. Возможные механизмы использования энергии, выделяющейся в процессе биокатализа. В процессе катализа, как было осознано уже на ранних этапах его исследования, должна выделяться или поглощаться энергия (часто переносимая зарядами, например, электронами). В связи с эти возникает вопрос о путях, по которым эта энергия осуществляется. Одним из аспектов этой проблемы является вопрос о механизмах использования энергии, выделяющейся в ходе каталитического акта. Впервые этот вопрос был поставлен, по-видимому, Э. Бауэром [22], который предполагал, что белки в биосистемах находятся в деформированном состоянии, которое восстанавливается до нормального состояния благодаря образованию комплекса субстрата с ферментом, а освобождающаяся при этом энергия идет на преодоление энергетического барьера реакции. В конечном счете, по мысли Э. Бауэра, эта энергия расходуется на восстановление деформированного состояния фермента, т. е. на подготовку следующего акта катализа.

Для обозначения процесса использования ферментом энергии, выделяющейся в ходе каталитической реакции, в работе [4] был предложен термин «рекуперация энергии». К идее повторного использования этой энергии пришел значительно позднее автор работы [23].

Дальнейшим шагом в развитии представлений о механизмах миграции энергии и «рекуперации» энергии в ходе каталитического акта можно считать концепцию «белок-машина», развивавшуюся в ряде работ [17, 24, 25]. Основное свойство любой машины — наличие выделенной степени свободы. Эта степень свободы играет функциональную роль, позволяя машине осуществлять полезную работы. В рамках концепции «белкок-машина» в ходе каталитического акта происходит перенос энергии вдоль выделенной степени свободы, сопряженный с продвижением системы вдоль координаты реакции. В работах [17, 18] предполагается, что химическое превращение субстрата происходит одновременно с конформационными превращениями фермент-субстратного комплекса — его релаксацией по пути с выделенной степенью свободы. При этом элементарный ферментативный акт рассматривается как процесс, состоящий из четырех стадий. На первой стадии — быстрой — идет образование фермент-субстратного комплекса (ФСК); на второй стадии — медленной — происходит медленная релаксация ФСК к новому состоянию и одновременной превращение субстрата в продукт; на третьей стадии комплекс фермент-продукт быстро распадается; на четвертой стадии — медленной — фермент релаксирует к исходному состоянию.

В качестве выделенной степени свободы в работе [26] была приведена замкнутая цепь переноса заряда (протона) в химотрипсине. Предполагалось также [24], что энергия в ферменте может запасаться в молекуле фермента в виде упругой деформации и сохраняться достаточно долго (вплоть до начала следующего каталитического акта). Близкие идеи развивались в работе [27]. Трактовка процесса рекуперации

энергии как пересечения поверхностей потенциальной энергии для реакций, содержащих экзотермический и последующий эндотермический этапы, дается в работе [28].

В рамках рассмотренных выше идей использования выделяющейся в ходе катализа ферментами энергии, ввиду отсутствия данных, редко рассматривались каких-либо конкретные структуры и какие-либо конкретные заряды. С появлением исследований по структуре отдельных ферментов эти представления стали приобретать все более конкретный характер. Обнаруженная впервые в структуре химотрипсина «система передачи заряда» [29] привлекла внимание исследователей в первую очередь потому, что позволила связать каталитические функции фермента с конкретными фрагментами этой структуры. Мы уже рассматривали ее в разделе 4.2.5. Эта протонно-релейная система, по мысли авторов работы [27], должна обеспечивать активацию С–ОН-группы серина, играющей важную роль в процессе гидролиза пептидной связи.

Дальнейшим обобщением роли таких систем в активных центрах ферментов явились концепции ЦПС О. М. Полторака [30] и кето-енольных таутомерных перестроек в процессе катализа Д. Е. Мецлера [29], также рассматривавшиеся в разделе 4.2.5. Несколько позднее сходные идеи были высказаны в работе [31]. Следует отметить, что авторы упомянутых работ допускают возможность прямого и обратного сдвига протонов, согласованного с перераспределением двойных и одинарных связей, однако уделяют мало внимания механизмам, обеспечивающим обратимость этого процесса.

Рассмотренные выше представления о катализе имеют ряд недостатков. В первую очередь, упускается из виду, что большинство ферментов функционирует как олигомерные структуры, состоящие из идентичных субъединиц (как правило, их количество четно) и обладающие пространственной симметрией. Кроме того, за исключением работ [30–32], во многих подходах недооценивается роль конкретных систем из аминокислот, связанных водородными связями. Не учитывается также возможная взаимосвязь активных центров различных субъединиц таких через такие системы. Наконец, последний, но немаловажный недостаток связан с тем, что рассмотренные подходы являются не эволюционными, так как не позволяют представить становление каталитических механизмов в процессе формирования ферментов.

10.2.3. Походы, учитывающие олигомерную структуру ферментов. Как мы видели в разделе 3.2.2, большинство белков, включая и ферменты, состоят из нескольких идентичных субъединиц, число которых, как правило, четно и обладают симметрией. Эти особенности ферментов стали учитывать уже в моделях катализа, основанных на конформационной подвижности белков. Так, в работе [33] на основе принципа «индуцированного соответствия» была предложена одна из первых моделей работы олигомерных ферментов. При этом использовалась идея о глобальной передаче конформационных изменений путем межсубъединичных взаимодействий. Эта модель была основана на двух постулатах: в отсутствие лиганда белок существует в одной конформации; связываясь с субъединицей белка, лиганд вызывает в ней конформационное изменение, которое может передаваться на другую субъединицу.

Для описания связывания в предложенной модели было необходимо вводить столько констант, сколько существует центров связывания. В некоторых случаях это усложняло интерпретацию наблюдаемых экспериментальных данных. Однако, в принципе, аксиоматика данной модели такова, что на ее основе могла быть описана кинетика практически любых олигомерных ферментов, для которых справедливо до-

пущение о «квазиравновесном связывании субстрата». В зависимости от количества субъединиц и схемы взаимодействия между ними модель допускала целый спектр состояний, как лишенных симметрии, так и имеющих симметрию более низкого порядка по сравнению с максимальной, наблюдаемой у свободного фермента.

В основу модели Моно и др. [34] были положены такие предположения:

— белки являются олигомерами;

— молекула белка находится в одном из двух состояний — T (tense — наряженном) и R (relaxed — расслабленном);

— формы белка находятся в равновесии, причем состояния R и T различаются как энергетически, так и по числу связей между субъединицами;

— форма T обладает большим сродством к ингибиторам, а R — к активаторам.

— в каждом состоянии все центры связывания эквивалентны и имеют одинаковые константы связывания (принцип симметрии).

Последний постулат, предполагающий сохранение пространственной симметрии при спонтанных изменениях конформациии сразу всех субъединиц в олигомере существенно отличает эту модель от подхода, развитого в работе [33] и позволяет использовать для описания кинетического поведения некоторых ферментов лишь три константы. Однако, эта модель не смогла предсказать, как это сделано в работе [33], такую особенность кинетики ферментов как отрицательная кооперативность. Напомним, что явление отрицательной кооперативности состоит в том, что некоторые олигомерные ферменты, по мере степени насыщения субстратом активных центров, проявляют все меньшую способность к его связыванию. Иными словами, каждая последующая связывающая субстрат субъединица при отрицательной кооперативности обладает все меньшей величиной константы связывания субстрата [35].

Неполнота модели привела к появлению гибридных ее вариантов. В частности, отрицательную кооперативность удалось объяснить на основе допущения «псевдоконсервативных» переходов и существования четвертичной структуры белков с максимальной и с субмаксимальной симметрией [36].

Для описания явления отрицательной кооперативности в свое время было предложено довольно много моделей, в том числе и представляющих этот процесс на уровне взаимодействия субъединиц. В качестве примера можно рассмотреть модель, развитую в работе [37]. В этой модели предполагается, что фермент имеет, в отличие от постулатов работы [31], не два состояния всей структуры, а два состояния активных центров — открытое и закрытое. В этом случае только открытый активный центр может обмениваться молекулами субстрата со средой, а каталитический акт происходит в закрытом активном центре. Явление отрицательной кооперативности оказывается связанным в этом случае с доступностью поступления субстратов в закрытый и открытый активный центры, которые, согласно автору работы [37], поочередно меняют свое состояние. При этом предполагается, что в процессе присоединения лиганды вызывают сопряженные конформационные флуктуации ферменты, причем их частота должна быть оптимальной для совершения катализа. Однако, в модели [37] практически ничего не говорится ни о сути процесса катализа, происходящего в закрытом активном центре, ни о физических механизмах, обеспечивающих синхронность сопряженных конформационных флуктуаций с катализом и сменой продукта на новую молекулу субстрата.

10.2.4. Реакционная способность половины от числа активных центров в олигомерных ферментах и ее возможные объяснения. В упомянутой выше работе [37] было предложено простое объяснение явления «реакционной способности половины от числа активных центров» (half site reactivity, half-of-the-sites reactivity), на основе механизма поочередности работы активных центров (флип-флопа). Впервые этот механизм был предложен в работах [38, 39] и неоднократно рассматривался в обзорах [40–43]. Он оказался удобной моделью для описания работы олигомерных ферментов, содержащих четное число субъединиц. При этом они имели следующие общие свойства:

1. Наличие сильной отрицательной кооперативности. На первых этапах насыщения активных центров субстратом каталитическая активность быстро возрастает, а затем, при насыщении примерно 50 % активных центров, резко замедляется («реакционной способности половины от числа активных центров»). Для таких ферментов характерно существование двух типов констант связывания активных центров (с сильным и со слабым сродством), а также низкое значение коэффициента Хилла (<1), являющегося характеристикой степени кооперативности взаимодействия субъединиц.

2. Обратимость связывания субстрата с половиной активных центров и временная инактивация, вызываемая рядом субстратов и ингибиторов.

3. Необратимость связывания половины активных центров, обусловленная некоторыми специфическими молекулами (так называемыми субстратами самоубийства ферментов — suicide substrates [44]).

В настоящее время известно довольно большое число ферментов (см. далее раздел 10.4), свойства которых можно описать на основе «флип-флоп»-механизма. Попытки дать возможные его объяснения предпринимались неоднократно. Так, в работе [45] димерный фермент рассматривался как система взаимодействующих осцилляторов, передающих друг другу энергию через слабое, «эластичное» сопряжение. «Флип-флоп»-механизм в этом случае является следствием попеременной миграции энергии между субъединицами. Авторы приходят к выводу, что описанный процесс наиболее бизко согласуется с возникновением асимметрии в результате конфориационных изменений вызванных ассоциацией субъединиц. Однако эта асимметрия, по мысли авторой, является динамической, поскольку флуктуационная энергия (и соответствующее конформационное состояние) непрерывно перетекает от одной субъединицы к другой. Эта асимметрия может быть «заморожена» только на одном из двух участков, что проявляется как «реакционная способность половины от числа активных центров». Этот подход в какой-то мере близок к нашей модели биокатализа и будет обсуждаться в последующих разделах. Однако, при всей его оригинальности, в нем отсутствует связь между процессом переноса энергии между субъединицами и ролью этого переноса в осуществлении каталитического акта. Кроме того, в данной работе не развиты представления о том, по каким конкретным структурам и с помощью какого механизма эта энергия передается.

В четвертой главе в числе прочих моделей переноса зарядов была рассмотрена возможность миграции заряда по полипептидному остову (модель «электронной тропы», раздел 4.2.2.2.). Эта модель послужила в качестве основы для объяснения кооперативных эффектов в белках [46]. Активность белков, согласно этим авторам, должна зависеть от статистического баланса электронного пула, мигрирующего то в одну, то в другую субъединицу. Однако, как мы упоминали в разделе 4.2.2.2, в мо-

дели «электронной тропы» существенно искажено реальное состояние дел в белках. Боковым цепям аминокислот приписывается роль энергетических ловушек и участия в скреплении конформации белка. Из рассмотрения исключаются кластеры из полярных аминокислот, связанные водородными связями, участвующие в катализе. Кроме того, для ее реализации олигомерная организация белка вовсе не требуется, поэтому исходя из модели «электронной тропы» механизм «флип-флопа» не является обязательным в катализе ферментами.

Еще одной гипотезой, направленной на объяснение явления «реакционной способности половины от числа активных центров» является представление о «линиях коммуникации», связывающих активные центры олигомерного белка [47]. Это представление возникло для объяснения различной реакционной способности тиоловых групп в креатинкиназе. По мысли авторов, «линии коммуникации» представляют собой участки в структуре фермента, передающие конформационные изменения от одного активного центра к другому. Хотя вопрос об асимметрической организации «линий коммуникации» является спорным, тем не менее, использование этих представлений для объяснения «реакционной способности половины от числа активных центров» в целом оправданно и полезно. В тоже время авторы не предлагают механизмов и не указывают конкретных носителей, обеспечивающих «канализованность» конформационных переходов при взаимодействии субъединиц.

В заключение этого раздела отметим, что общим недостатком предложенных объяснений «флип-флоп»-механизма является, на наш взгляд, отсутствие разработанной целостной модели катализа, в которой бы данный механизм явился абсолютно необходимым следствием тех механизмов, которые лежат в основе процесса катализа. Кроме того, эти модели являются не эволюционными и на их основе трудно представить, как «флип-флоп»-механизм мог возникнуть и совершенствоваться в процессе эволюции.

10.2.5. Особенности современного этапа исследований биокатализа. Проведенный нами анализ литературы последних лет показал, что в настоящее время отсутствует какой-либо общепринятый взгляд или модель на процесс биокатализа. К этому есть определенные причины. Тенденции исследований, наметившиеся в конце 80-х годов, состояли в том, чтобы изучать конкретные ферменты, структуры которых к этому времени уже стали доступны для РСА. В настоящее время эти тенденции существенно усилились и практически исследование каждого нового фермента стремятся довести до получения в кристаллическом виде и изучения его структуры методом РСА. Получаемая при этом информация представляет собой исключительно важный материал для анализа конкретных деталей катализа тем или иным ферментом.

Однако отсутствие единого концептуального взгляда на биокатализ существенно обесценивает получаемую информацию, поскольку нет полного понимания того, а как же, собственно говоря, работает тот или иной фермент. В свете этого, как мы убедились из просмотра литературы, существенно снизился интерес к изучению взаимодействия активных центров различных субъединиц и к проблеме «флип-флоп» механизма. Количество работ в этом направлении существенно сократилось, а главное, что они, вопреки тому, что можно было бы ожидать, как правило, не являются структурными.

В то же время, развиваемые в настоящее время идеи туннелирования электронов и протонов (см. раздел 4.1.2) в белках распространяются авторами и на биокатализ. С этих позиций написан ряд полезных в отношении фактического материала теоретических работ [48, 49], а также обзоры [50, 51]. Мы уже анализировали идеи туннелирования и получаемые на их основе результаты в четвертой главе. Основной вывод, к которому мы пришли, состоит в том, что этот механизм не может лежать в основе биоэнергетических процессов, в том числе и биокатализа, так как не соответствует требованиям, которым этот механизм должен удовлетворять с точки зрения электроники (раздел 4.2.6.).

Вместе с тем, учитывая тенденции в исследовании ферментов, открываются возможности для отыскания элементов нашей модели в известных структурах ферментов (см. раздел 10.3).

10.2.6. Модель катализа на основе ССИВС и существующие представления о механизмах работы ферментов. Как мы уже упоминали в конце раздела 10.1.5, согласно идее высказыванию, сделанному в работе [5], что всякая новая концепция ферментативного катализа должна включать старые теории в качестве частных случаев. Проведение такого сопоставления нашей модели катализа, конкретным приложением которой является биокатализ, с предшествующими концепциями катализа ферментами, позволит выявить, в какой степени наша модель подходит под это определение.

Как и в концепции Кошланда и др. [33], в нашей модели связывание субстрата инициирует процесс индуцированного соответствия структуры фермента промежуточному состоянию субстрата. При этом предлагаются конкретный механизм, приводящий в движение это соответствие — ССИВС, опосредующие согласованные с изменениями состояния субстрата перестройки конформации фермента (см. раздел 10.1.5, рисунки 10.4 и 10.5). Энергия, выделяющаяся в ходе образования ФСК (в частности, это может быть избыточный заряд, например, электрон или протон), как и в работе [4], согласно нашей модели, рекуперируется катализатором и снова передается по петле обратной связи к субстрату, понижая энергию активации последующих стадий катализа. При этом для реализации этой идеи недостаточно только наличия функциональных групп, контактирующих с субстратом (роль катализатора (фермента) в этом случае сводится к фиксации их расположения в пространстве [10]), а необходима вся структура олигомерного катализатора, включая и соседнюю субъединицу.

В отличие от работ [17, 24, 25], предполагающих наличие в структуре фермента выделенной степени свободы, ССИВС в нашей модели могут рассматриваться как конкретное физико-химическое воплощение этих представлений. Существенные отличие при этом состоит в том, что выделяющаяся энергия в процессе рекуперации не запасается катализатором в виде напряжений, как это предполагается в работах [25, 26], а постоянно мигрирует, причем динамика этих перемещений синхронизована со стадиями катализа. Подчеркнем также, что основную роль в обеспечении синхронизации, согласно нашей модели, выполняют не только боковые цепи аминокислот (базовые элементы), но и системы HN–C=O-групп основной цепи, формирующие базовую архитектуру белка.

Согласно нашей модели, быстрая миграция заряда по ССИВС должна обеспечивать сопряженные со стадиями катализа конформационные изменения структуры катализатора. Похожие на первый взгляд идеи выказаны в работе [17]. Однако, при

рассмотрении фермента в качестве молекулярной машины определяющая роль отводится именно конформационным изменениям ФСК, следующим за присоединением субстрата к активному центру, тогда как у нас они, наоборот, они сопровождают процесс переноса зарядов по ССИВС и обратимые их перестройки. Эти изменения носят характер релаксации к новой равновесной конформации, появившейся после локальных микрохимических изменений (нашем понимании — перестройки структуры функциональных блоков ССИВС, см. раздел 7.2).

Существенной особенностью нашей модели катализа является то, что в ее основе лежит механизм переноса зарядов по ССИВС, который, как правило, может быть реализован симметричной дуплицированной структурой, состоящей из идентичных субъединиц. Эта структура претерпевает обратимые структурные изменения (конформационные переходы), сопряженные с поочередной работой активных центров. Близкие к нашим представления о переносе зарядов по системам полярных групп развиваются в работах [30–32]. Однако авторы этих работ не учитывают возможности взаимосвязи каталитических механизмов в субъединичной организацией биокатализаторов, вследствие чего колебательный режим функционирования ферментов оказался вне их рассмотрения.

Представления о попеременном открывании и закрывании активных центров, развиваемые в работе [37], лишены конкретных механизмов для их реализации. В нашей модели этот механизм осуществляется в процессе переноса зарядов по ССИВС путем разрыва старых и образования новых водородных связей (см. рис. 10.5). При этом модель допускает спектр состояний как отклоняющихся от полной симметрии, так и симметричных. В этом отношении она близка к модели [33]. В то же время, модель, постулирующая лишь два состояния [34], представляется с наших позиций упрощенной.

Анализ современного состояния литературы показывает, что исследователи не столь существенно, как можно было бы ожидать, продвинулись к пониманию сущности биокатализа. Популярная в свое время идея кислотно-основного катализа в активных центрах ферментов [48], по-прежнему привлекает внимание исследователей. При этом проводится тщательный анализ роли протонов в этом процессе [49]. В нашей модели сформулированы общие представления о принципах катализа, увязанные со структурой ферментов. Отсутствие таких общих представлений ограничивает этот анализ, в основном, рассмотрением области взаимодействия субстратов с активными группами ферментов, без учета их олигомерной организации.

С другой стороны, широко известные идеи туннелирования протонов и электронов [49–52], внедряемые авторами в биокатализ, хотя и претендуют на роль общих биоэнергетических механизмов, но имеют ряд недостатков (раздел 4.2.6.). В частности, они не в состоянии объяснить, как это сделано в нашей модели, природу субъединичного строения ферментов и явление реакционной способности половины от числа активных центров [39–41],.

Таким образом, сопоставление нашей модели с известными представлениями о биокатализе показывает, что она включает как элементы сходства, так и различия с высказывавшимися в разное время взглядами на биокатализ. В то же время, она представляет собой целостную концепцию, более общую, по сравнению с этими моделями. По существу, каждая из этих упомянутых моделей охватывает лишь отдельные аспекты в поведении биокатализаторов, в то время как наша модель учитывает большую часть этих особенностей. Это позволяет нам положить ее в качестве

концептуальной основы для анализа работы конкретных ферментов и поиска в них элементов, реализующих эти представления.

10.3. Приложение модели катализа на основе ССИВС к реальным ферментам

10.3.1. Выбор объектов для анализа. Предложенная модель катализа на основе ССИВС может и должна быть подтверждена экспериментально. Мы полагаем, однако, что осуществить эту задачу целиком на данный момент вряд ли возможно. Одной из причин этого является то, что полная (динамическая) модель предполагает обратимую перестройку ССИВС в процессе работы катализатора, в то время как изучение структуры кристаллов ферментов обычно проводится в статике, когда их структура фиксирована. По этой причине мы можем находить в структуре фермента лишь отдельные фрагменты ССИВС, которые соответствуют какой-либо стадии в работе фермента и на их основе пытаться реконструировать весь ход катализа. Чтобы полностью проследить их перестройку нужно иметь целый набор стадий, а это не всегда технически возможно. Тем не менее, поиск таких элементов может способствовать как уточнению и конкретизации модели, так и более глубокому пониманию механизма работы отдельных ферментов.

Универсальный характер механизма переноса зарядов по ССИВС, лежащего в основе нашей модели катализа, предполагает, что элементы модели можно найти в любом ферменте. Поэтому нет необходимости рассматривать все разнообразие ферментов. Достаточно показать те или иные аспекты модели на каких-либо наиболее демонстративных объектах. Мы покажем на структуре двух известных ферментов — алкогольдегидрогеназы лошади (АДГ-Л) и Н-аденозинтрифосфатазы быка (H^+-АТФА-зы) следующие элементы модели:

— наличие блоков ССИВС, связанных кофакторами фермента;

— связь субстратов с ССИВС;

— взаимосвязь активных центров и кофакторов через субъединицы;

— роль аллостерических регуляторов как замыкателей ССИВС;

— «флип-флоп»-механизм в работе ферментов.

Все эти элементы будут рассматриваться практически одновременно в процессе анализа. Отметим, что для обсуждения будут выбраны структуры по следующим критериям, выработанным на основе нашей модели:

— фермент получен и изучен в виде олигомера;

— в структуре имеются кофакторы и субстраты или их аналоги;

— между субъединицами имеется плотный контакт;

— структура субъединиц фермента имеет как элементы симметрии, так и асимметрии.

В настоящее время такие критерии при отборе литературы для анализа ферментов отсутствуют. Руководствуясь эти критериями, мы использовали для анализа далеко не весь массив структур известных для этих ферментов.

10.3.2.1. ***Общая характеристика дегидрогеназ.*** Дегидрогеназы — один и крупнейших классов ферментов (класс 1.). Ферменты, принадлежащие к этому классу, осуществляет отщепление протонов от субстратов и, как следствие, его окисление. Например, спирты превращаются ферментом алкогольдегидрогеназой (ЕС

1.1.1.1.) в альдегиды и кетоны. Особенностью дегидрогеназ является наличие в их структуре кофакторов — никодинамид-аденин-динуклеотида (НАД) и никодинамид-аденин-динуклеотид фосфата (НАДФ), а также флавинсодержащих нуклеотидов — флавинмононуклеотида (ФМН) и флавин-аданин-динуклеотида (ФАД). Структура многих дегидрогеназ хорошо изучена. Мы не будем касаться всех дегидрогеназ, а сосредоточим свое внимание лишь на некоторых, хорошо изученных НАД- и НАДФ-содержащих ферментах. К таким НАД-содержащим ферментам относятся алкогольдегидрогеназа [54], лактатдегидрогеназа [55], малатдегидрогеназа [56] и D-глицеральдегид-3-дегидрогеназа [57], причем первые три известны в основном как димеры, а четвертый — как тетрамер. Примером НАДФ-содержащего фермента является каталаза [58], также являющаяся димером. Перечисленные НАД-содержащие ферменты являются примерами ферментов, проявляющими «реакционную способность половины от числа активных центров» [59–70]. В качестве основного объекта, на котором мы попытаемся провести поиск элементов нашей модели, был выбран фермент алкогольдегидрогеназа печени лошади (АДГ-Л). Остальные дегидрогеназы будут служить в качестве дополнительного фактического материала.

10.3.2.2. ***Отбор структур для анализа.*** Для АДГ-Л известно более тридцати структур. Изучением структуры этого фермента в настоящее время занимаются, в основном, три группы исследователей: под руководством Б. В. Плаппа [71–77], с участием Е. С. Цедергрен-Зеппензауэра [78–80] и Б. М. Гольдштейна [81, 82]. При анализе структур, полученных этими авторами, будут использоваться общепринятые обозначения файлов Protein Data Bank. Известны кристаллические структуры отдельных субъединиц фермента, димеров (в виде которых он выделяется) и тетрамеров (две пары димеров в одной кристаллической ячейке). Мы подразделили эти структуры на группы:

— с низким разрешением (2,4–3,1 Å): 5ADH, 7ADH, 8ADH, 1ADG, 1ADF, 1QLJ, 1A72 (1 субъединица); 6ADH, 1ADC, 1ADB (димеры), 1LDE, 1LDY, 1AXG (тетрамеры);

— с высоким разрешением (1,8–2,3 Å): 1QLH (1 субъединица); 2OXI, 2OHX, 1QV6, 1QV7, 1JU9, 1HLD, 1HF3, 1AXE, 1A71 (димеры); 1MG0, 1BTO (тетрамеры);

— со сверхвысоким разрешением (1,1–1,6 Å): 1YE3 (1 субъединица); 1N92, 1N8K, 1MGO, 1HEU, 1HET (димеры); 3BTO, 1P1R (тетрамеры).

Структуры, изученные с низким разрешением, не представляют для нас существенного интереса, поскольку при выделении ССИВС в них возникает ошибок. Кроме того, исследование мономеров не дает картины взаимосвязей между субъединицами, как этого требует наша модель. По этой причине в нашем анализе были использованы кристаллические структуры димеров и тетрамеров АДГ-Л, исследованные с высоким и сверхвысоким разрешением, а структуры первой группы и мономеры всех групп к анализу почти не привлекались. Отметим, что все использованные для анализа структуры содержат в своем составе кофакторы и аналоги субстратов.

10.3.2.3. ***Краткая характеристика структуры.*** АДГ-Л представляет собой димер с молекулярной массой 80 kDa. Каждый мономер состоит из хорошо обозначенных доменов, связывающих субстрат и кофактор ($НАД^+$, НАДН). Присоединение $НАД^+$ стабилизирует конформационные переходы от «открытой» к «закрытой» форме, путем сближения междоменную полость [83]. Связанный с цинком субстрат (спирт) закрепляется вблизи $НАД^+$, обеспечивая непосредственный перенос атома

водорода к атому С4 никотинаминого кольца [84]. Как и для других дегидрогеназ, для АДГ-Л характерно наличие антипараллельной β-структуры в области контакта субъединиц (см. раздел 3.2.4.2).

10.3.2.4. ***Анализ структуры ССИВС.*** Определяющую роль в формировании ССИВС фермента АДГ-Л играет кофактор — НАД. В разделе 7.2.2 мы уже проводили анализ ряда кофакторов на основе нашего подхода. Аналогичный анализ можно провести и для НАД.

Концепция ССИВС предсказывает, что на основе молекулы НАД в структуре фермента должно существовать не менее трех блоков ССИВС:

— адениловый блок должен окружать молекулу аданина;

— дифосфатный блок должен быть связан с двумя фосфатными группами;

— никотинамидный блок должен формироваться вокруг никотинамида.

Действительно, все эти блоки, более менее ярко выраженные, можно найти в проанализированных структурах. В качестве примера приведем оригинальные рисунки и вычерченные на их основе схемы связей этих блоков файла.

Адениловый блок. Как показал анализ структур, блок находится в двух состояниях: изолированный от других блоков в обеих субъединицах (файлы 1MG0, 1BTO, 1P1R, 1JU9, 1AXE, 1HLD, 2OHX, 2OXI), и связанный с другими блоками в одной из субъединиц (1 A71, 1HF3, 1QV6, 1QV7, 1HET, 1HEU, 1MGO, 1MG0, 1N92, 1BTO, 3BTO). На рисунках 10.6, *а*, *б* показан изолированный адениловый блок. Из рисунков видно, что в этом состоянии он имеет ограниченное число связей ССИВС — с Arg 271 и HN-C=O-группой (224, 223).

Адениловый блок обычно связан с дифосфатным блоком (рис. 10.6, *в*). В этом случае связь осуществляется обычно с N_3, O–C=O Asp 223, O_3' (кислород рибозы) и HN–C=O (201 200)-группу, через вилочковую связь которой он подключается к O_5O–P=O-группы дифосфатного блока (файл 1 A71).

Дифосфатный блок. Этот блок может находиться в четырех состояниях: изолированном, связанном с адениловым блоком, с никотинамидным, и с обеими блоками одновременно. В изолированном виде он хорошо выявляется в структуре файла 1HEU (рис. 10,7, *а*). Схематически ССИВС этого блока показаны на рис. 10.7 *б*. Как хорошо видно на обоих рисунках, дифосфатная группа (на рис. 10.7, *а* выделена малым прямоугольником, а 10.7, *б* — жирным шрифтом) находится в окружении большого числа ССИВС. С левой стороны атом O_2 верхнего фосфата связан с Arg 47 и расположенным в конце ССИВС Asp 360. В то же время, резонансная группа O_1–P=O_2 нижнего фосфата входит в состав ССИВС, состоящую из двух разных по составу частей. Атом O_1 этой группы связан с Arg 369, от которого расходится два протяженных участка ССИВС. Один из них направляется влево и включает Cys 46, His 67 и Asp 49, а другой направляется вправо и присоединяется к одной из α-спиралей, расположенных с правой стороны. Атом O_2 этой группы присоединяется к двум α-спиралям (на рис. 10.7, *а* выделены двумя большими прямоугольниками), образующими ветвистый каскад ССИВС. Как показал анализ, ССИВС этого блока находятся в пределах одной субъединицы и не переходят в другую.

Никотинамидный блок. Никотинамидный блок также наблюдается в связанном с дифосфатным и никотинамидным блоками и в изолированном виде. Такой изолированный блок и его схема ССИВС показаны на рис. 10.8, *а*, *б*. Молекула никотинамида обведена на обоих рисунках прямоугольником. Особенность этого блока состоит

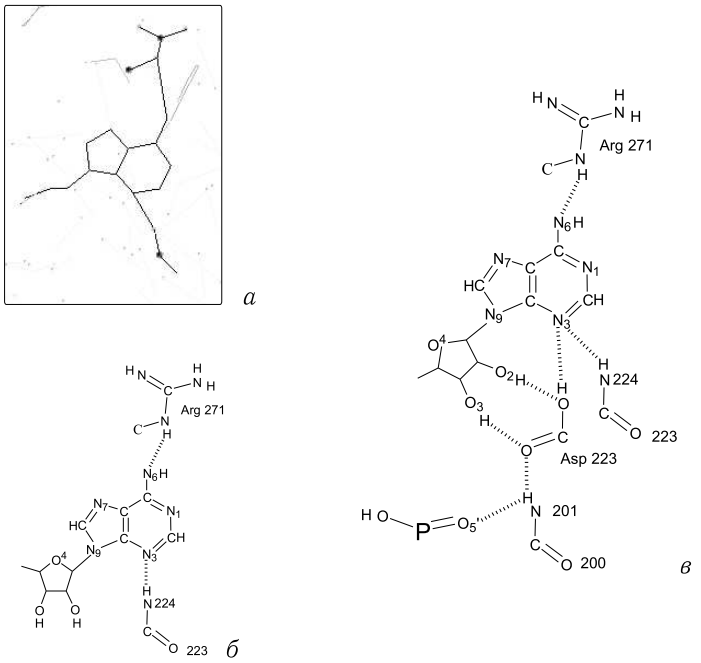


Рис. 10.6. Структура изолированного (*а*, *б*) и связанного с дифофосфатным блоком (*в*) аденилового блока по данным файла 1 A71: *а* — рисунок на основе файла; *б*, *в* — схемы ССИВС

в том, что он включает в свой состав элементы α-спирали (на рис. 10.8, *б* выделены жирным шрифтом справа вверху) и антипараллельной β-структуры. Последняя структура хорошо видна как на рисунке, так и на схеме. Именно эта структура имеет выход в область контакта субъединиц. При образовании димера формируются единые ССИВС, связывающие оба никотинамидных блока, что показано на рис. 10.9. Молекулы никотинамидов выделены в прямоугольниках. Этот факт имеет, очевидно, принципиальное значение для функционирования фермента в виде димера. На рисунке видно также, что в этой структуре помимо никотинамидов в формировании ССИВС участвует адениловый блок А-субъединицы (молекула аденина справа выделена также прямоугольником). Эта связь в данной структуре осуществляется между N_5H аденина и O=C–NH-группой (222, 223), входящей в ССИВС никотинамидного блока.

Отметим, что при выделении никотинамидного блока ССИВС в димере наблюдаются некоторые отличия от результатов, получаемых на одной субъединице. Так, в обеих субъединицах димера виден фрагмент ССИВС, содержащий аминокислоты Tyr 286 и Arg 101, обозначенные на рис. 10.9. Такие различия могут быть связаны как с особенностями компьютерных расчетов для мономеров и димеров, так и с появлением новых путей, которые возникают только в состоянии димера. В целом, проведенный в этом разделе анализ показал, что структурные данные подтверждают наличие в АДГ-Л следующих элементов нашей модели:

— наличие блоков ССИВС, связанных с кофакторами фермента;

— взаимосвязь активных центров и кофакторов субъединиц через ССИВС.

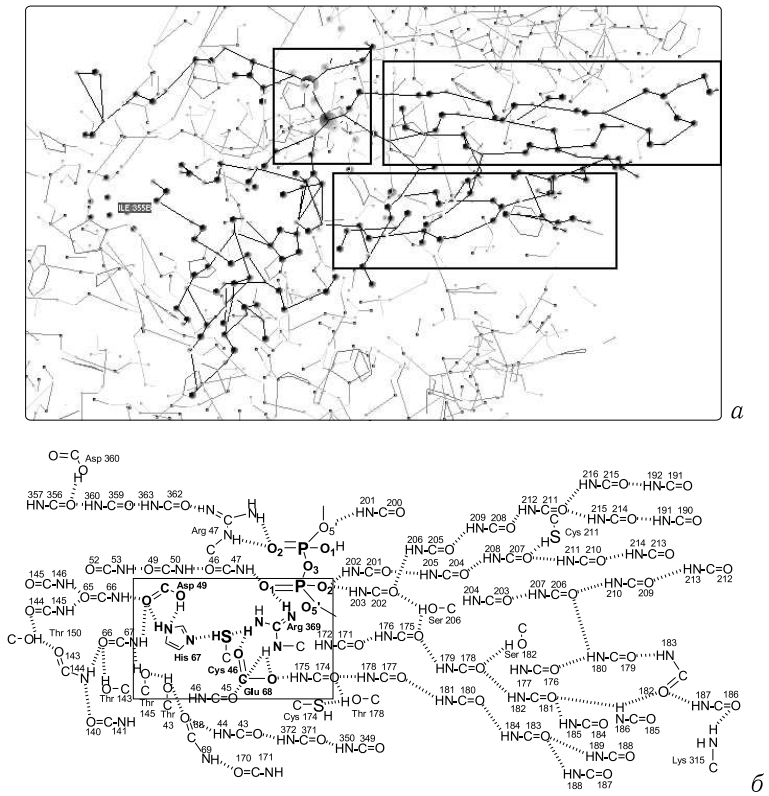
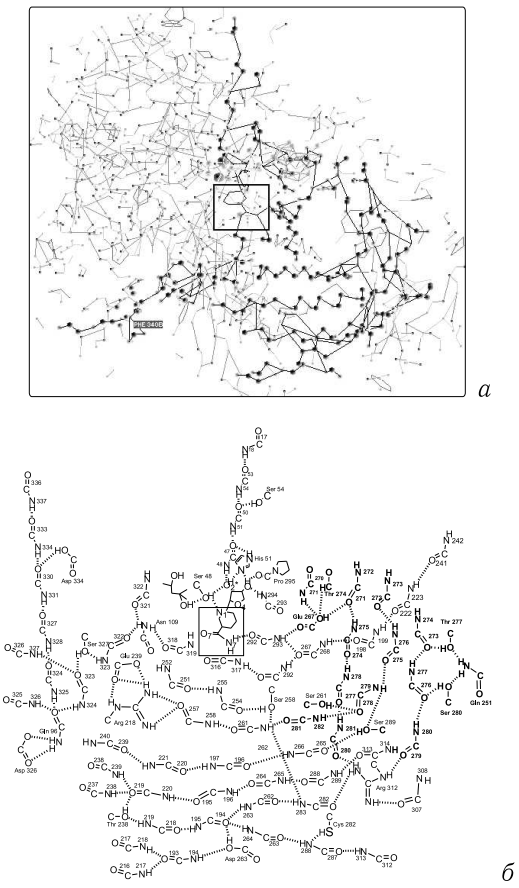


Рис. 10.7. Структура изолированного дифосфатного блока (файл 1HEU): *а* — рисунок из файла; *б*, *в* — схемы ССИВС

10.3.2.5. ***Связь аналогов субстратов с ССИВС активных центров.*** Использование субстратов при исследовании структуры ферментов, как правило, не проводится, поскольку фермент в этом случае каталитически активен и находится в динамическом состоянии, что не позволяет получить его в кристаллическом виде. По этой причине практически все структуры АДГ-Л, использованные для анализа, содержали аналоги субстратов.

В большинстве изученных структур, за исключением 1MGO (аналог субстрата — фторбензиловый спирт) аналоги субстратов взаимодействуют с ССИВС и включаются в них, хотя характер взаимодействия часто различен. Наиболее типичным является включение в ССИВС трифторэтанола — фторзамещенного аналога субстрата (файл 1AXE), показанное в виде схемы на рис. 10.10.

Из схемы видно, что C–OH-группа трифторэтанола включается в ССИВС с трех сторон. Слева она присоединена к N–C=N-группе His 67, связанной с O–C=O-группой и Asp 49, которые, как показано на рис. 10.7 (выделены ширным шрифтом в прямоугольнике), входят в ССИВС, образующих дифосфатный блок. В этот же блок входят C–S-группы Cys 174 и Cys 46, расположенные снизу и слева вверху от аналога субстрата. Cys 46 образует водородную связь с Arg 369, который непосредственно связан водородной связью с O=P–O-группой (см. также рис. 10.7). Характерно, что



а *б*

Рис. 10.8. Структура никотинамидного блока B-субъединицы (файл 1HEU): *а* — рисунок из файла; *б* — схема ССИВС

поблизости находится цикл Trp 93, который наша программа выявляет связанным с C–S-группы Cys 174 A-субъединицы, в то время как в B-субъединице водородной связи между ними нет. Сходные связи субстрата с ССИВС выявляются для структур 1A71 (аналог — тот же), а также 1HLD (аналог 2,3,4,5,6-пентафторбензиловый спирт), 1QV6 (аналог 2,4-дифторбензол), 1QV7 (аналог — 2,3-дифторбензол), 1N92 (4-иодпиразол). Во все отмеченных структурах наблюдается включение субстратов в ССИВС обеих субъединиц, причем дифосфатные блоки связаны с никотинамидными, а последние — между собой через β-структуру области контакта субъединиц. Таким образом, в приведенных примерах существуют следующие элементы нашей модели:

— участие субстрата в составе ССИВС фермента;

— взаимосвязь субстратов в отдельных субъединицах, что необходимо для реализации «флип-флоп»-механизма и участия второго субстрата в катализе в качестве аллостерического регулятора.

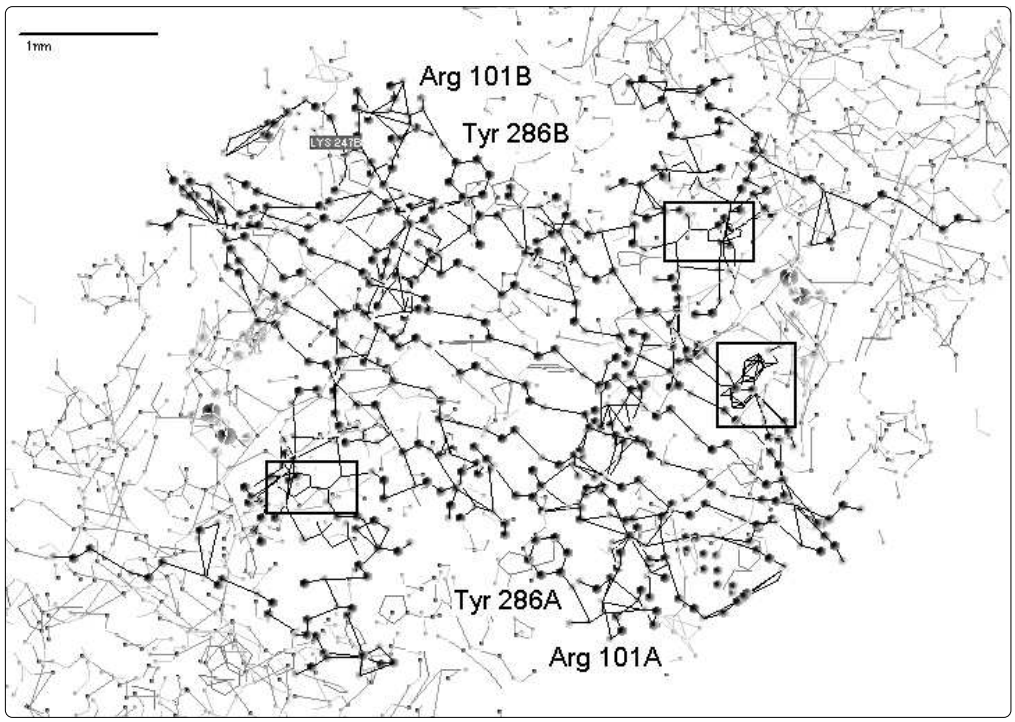


Рис. 10.9. Взаимосвязь никотинамидов A (слева) и B субъединиц алкогольде-гидрогеназы печени лошади через β-структуру (файл 1HEU)

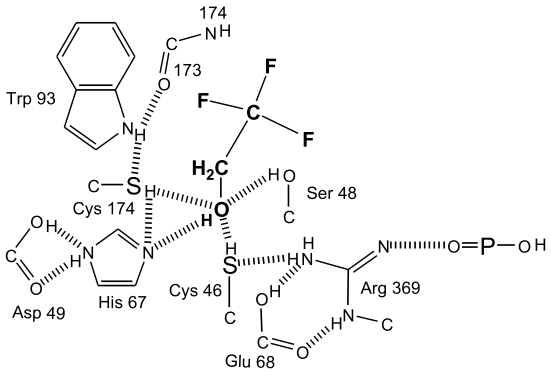


Рис. 10.10. Схема взаимодействия трифторэтанола (аналога субстарата) с функциональными группами активного центра АДГ-Л (файл 1AXE)

С небольшими отклонениями близкие взаимосвязи можно наблюдать и в других комплексах аналогов субстратов и ингибиторов с ферментом (2OHX, 2OXI, 1P1R, 1BTO, 3BTO).

10.3.2.6. ***Возможность реализации «флип-флоп» механизма на основе ССИВС.*** Интересное состояние структуры было выявлено в комплексе АДГ-Л с аналогом субстрата 3-бутилтиоланом 1-оксидом (файл 3BTO, разрешение

1,66 Å). В нем кристаллизуется два димера (пары A-D, B-C), причем наибольший интерес представляет пара A–D. В этой паре в D субъединице аналог субстрата

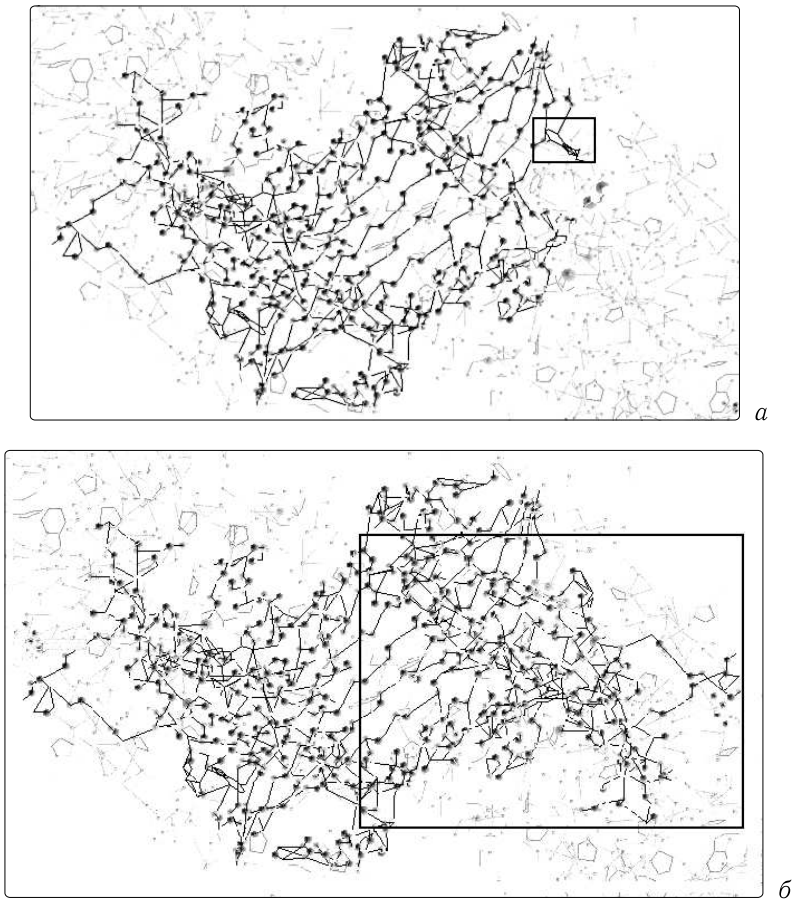


Рис. 10.11. Возможность «флип-флоп» механизма катализа в комплексе АДГ-Л с аналогом субстрата 3-бутилтиоланом 1-оксидом

образует комплекс, в который входит блоки ССИВС аденина, дифосфатный и никотинамидный. Последний связан через β-структуру с никотинамидным блоком A-субъединицы. В целом, это состояние показано на рис. 10.11, *а*. В тоже время, в A-субъединице 3-бутилтиолан 1-оксид находится в комплексе только с дифосфатным блоком (обведен прямоугольником), в то время как адениловый (показан на рис. 10.11, *а* в прямоугольнике) и никотинамидный блоки от него отсоединены.

Такой яркий пример асимметрии состояний двух субъединиц позволяет легко представить флип-флоп механизм катализа, известный для этого фермента [59–62]. Можно предположить, что связывание субстрата с A-субъединицей будет сопровождаться его активацией за счет связи с ССИВС фосфатного блока. Затем будет иметь место изменение конформации, приводящее к включению аденилового (регуляторно-

го) и никотинамидного (на который происходит перенос протона) блоков ССИВС. Регуляция этого процесса может происходить при участии блоков ССИВС второй субъединицы, с которой эти блоки связаны через область контакта. После завершения каталитического акта в А- субъединице, может начаться активация субстрата в D-субъединице и т. д. Мы не претендуем в данной монографии дать развернутую модель работы АДГ-Л. Мы лишь показали, что «флип-флоп» механизм катализа при участии ССИВС вполне может существовать в структуре этого фермента.

Таким образом, как следует из приведенного анализа, все элементы модели катализа на основе ССИВС нашли свое отражение в структуре фермента АДГ-Л. Аналогичный анализ и детальное построение моделей катализа может быть осуществлено и для других ферментов класса дегидрогеназ, перечисленных в разделе 10.3.2, а также, с учетом конкретных особенностей, и для других классов ферментов.

10.3.3.1. ***Краткая характеристика H-аденозинтрифосфатазы.*** Молекула АТФ является одним из наиболее распространенных доноров зарядов в биоструктурах. В отличие от ионов рутения (Ru), рения (Re) и родия (Rh), используемых для моделирования туннельного механизма переноса зарядов (см. разделы 4.1.2 и 4.1.3), молекулы АТФ и других нуклеотидов являются естественными донорами зарядов. Процесс освобождения зарядов, появляющихся в процессе распада нуклеотидтрифосфатов, обеспечивается ферментами, активные центры которых имеют специфическую организацию.

Для того, чтобы показать сомнительность модельного подхода, получившего, как мы писали во второй главе, доминирующее положение в современной литературе по механизмам переноса зарядов в биоструктурах, мы обратились к анализу фермента H-аденозинтрифосфатазы (H-АТФ-азы, F_1F_0-АТФ синтазы). Этот комплексный фермент (см. раздел 4.1.1.5) осуществляет синтез молекул АТФ из АДФ и $P_{н.}$, путем использования энергии, выделяющейся в ходе восстановления молекул кислорода до воды (у животных) или фотолиза воды до молекул кислорода (в растениях).

Для нашего анализа был использован фермент F_1F_0-АТФ синтаза быка (EC 3.6.1.34) в изучении которого в последние годы сделаны большие успехи [85] (файлы 1E1Q, 1E1R), [86] (файл 1H8E). Как уже рассматривалось в четвертой главе, фермент состоит из 5 субъединиц, со стехиометрией $\alpha_3\beta_3\gamma_1\delta_1\varepsilon_1$ (см. рис. 4.3). Три пары αβ субъединиц, близких по структуре, закреплены на «стебле» (роторе), вокруг которого, как предполагают современные модели, они вращаются.

10.3.3.2. ***Особенности ССИВС, сформированных вокруг субстрата.*** С использованием концепции ССИВС в разделе 6.2.7 было показано, что в структуре молекулы АТФ можно выделить два фрагмента, вокруг которых возможно формирование блоков ССИВС: адениловый и трифосфатный. Как показал анализ с помощью программы Protein 3D, действительно такие блоки, часто взаимосвязанные, имеются во всех изученных структурах АТФ синтазы быка. Для демонстрации ССИВС мы использовали файл 1H8E, в котором получены структурные данные с наибольшим в настоящий момент разрешением (2,0 Å). Отметим, однако, что вместо АТФ в этой структуре находится АДФ, поэтому информация о ССИВС, образуемых последней фосфатной группой, которая отщепляется в процессе гидролиза, отсутствует. По данным для других вариантов структур ССИВС этой группы являются сравнительно короткой.

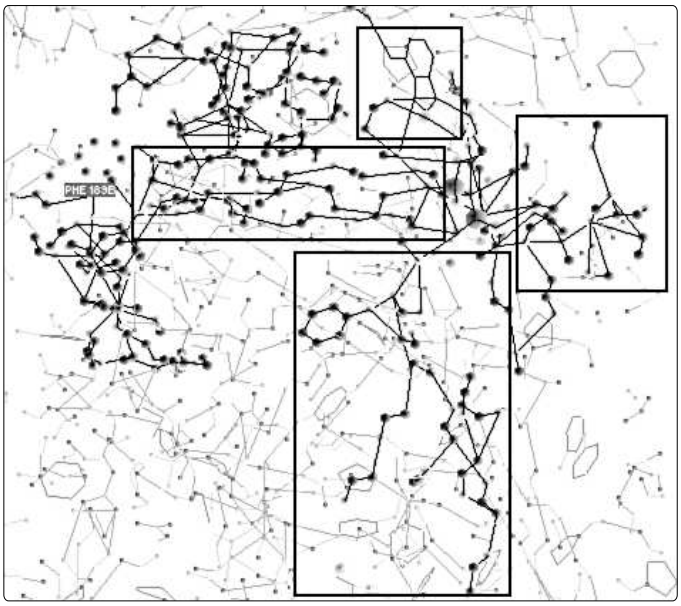


Рис. 10.12. Структура ССИВС, окружающих молекулу АДФ в B-субъединице F_1F_0-АТФ синтазы быка (файл 1H8E)

В структуре фермента имеется три субъединицы α-типа (A, B и C) и три — β-типа (D, E и F). Для анализа ССИВС была использована B-субъединица. На рис. 10.12, а видно, что молекула АДФ, как и предполагалось на основе нашей концепции, находится в окружении ССИВС. Вокруг кольца аденина (в квадрате) имеется сравнительно немного водородных связей, в то время как фосфатные группы окружены ССИВС с трех сторон (в прямоугольниках).

Более детально характер ССИВС показан на схеме (рис. 10.13). Основные атомы в молекуле АДФ выделены жирным шрифтом. На схеме видно, что адениловаое кольцо через C–OH-группу Ser 177 имеет связь с дифосфатной группировкой. Эта группировка образует ССИВС со спиральным фрагментом, содержащим три системы HN–C=O-групп. К этому фрагменту прикрепляются две ветви ССИВС, из которых одна, направленная вниз, связана с Tyr 228 и содержит N–C=N-группы Arg 161 и His 263, а другая, направленная вверх, включает O–C=O-группу Asp 154 и N–C=N-группы Arg 188.

Кроме спирального участка, к O_{2B} атому O_{2B}–P_B=O_{1B}-группировки через Thr 176, Asp 269 Tyr 203 присоединяется вторая протяженная ССИВС из HN-C=O-групп. Вблизи от C–OH-группы Thr 176 и атома O_{2B} фосфатной группы находится атом Mg^{++}, вероятно связанный с последними ионной связью. Наконец, к O_{1B}, через Lys 175 прикреплена третья протяженная ССИВС.

Следует отметить, что в остальных α-субъединицах (A, C) наблюдается аналогичный принцип строения ССИВС, хотя в деталях имеются некоторые различия. В отличие от α-субъединиц, β-субъединицы имеют существенно более простую, редуцированную структуру ССИВС. Во всех трех субъединицах β–типа (D, E и F) присутствует фрагмент α-спирали; O–C=O-группа Asp, образует водородную связь с C–O-группой Ser, а последняя присоединена к O_{2B} атому фосфатной группировки;

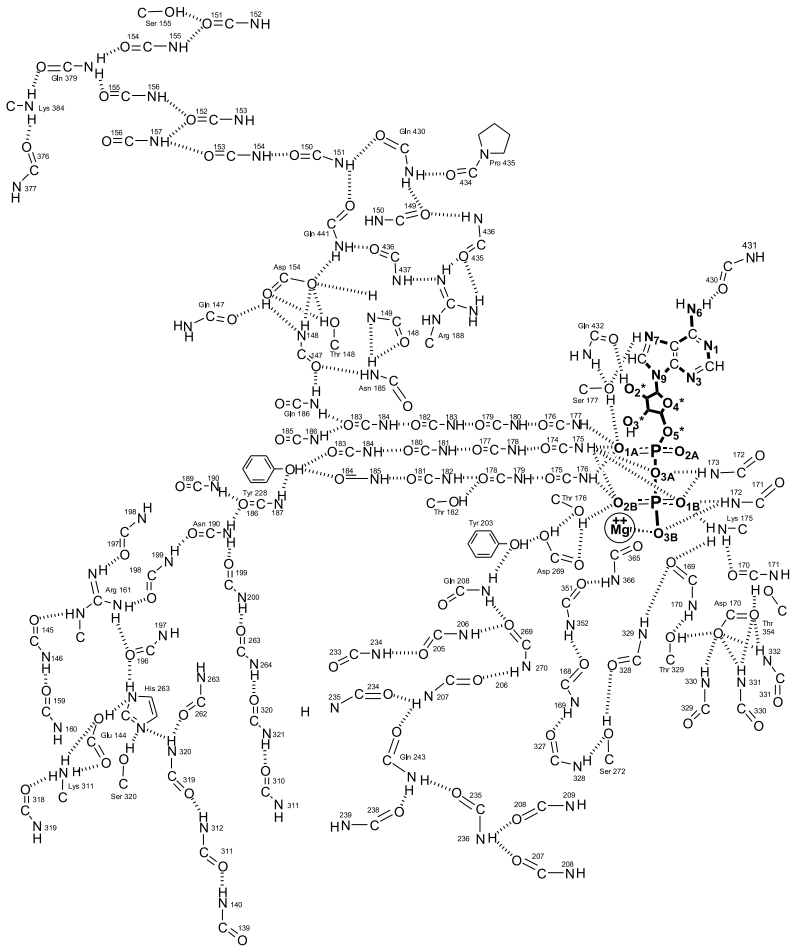


Рис. 10.13. Схема строения ССИВС B-субъединицы F_1F_0-АТФ синтазы быка (по рис. 10.12)

C–N-группа Lys связана с O_{1B} и O_{3B} атомами фосфатной группировки, т. е. аналогично α-субъединицам (см. рис. 10.12), хотя номера аминокислот не такие, как у α-субъединиц.

10.3.3.3 Взаимосвязь субстратов через ССИВС субъединиц

Мы проанализировали ССИВС всех известных нам структур F_1F_0-АТФ синтазы быка, связанные с субстратами и их аналогами в нескольких субъединицах. Оказалось, что в некоторых из них ССИВС связывают субстраты в виде пар, переходя из одной субъединицы в другую. Так, в наиболее детальной из известных структур (файл 1H8E, разрешение 2 Å) через ССИВС связаны субстраты субъединиц A+E, B+F, C+D, что соответствует сочетанию (α+β). Вид этих ССИВС показан на рис. 10.14. Из рисунка видно, что субъединицы A, B и C (на рисунке они все слева), имеют более разветвленные ССИВС, в то время как субъединицы E, F и D (в кружках) имеют сравнительно короткие ССИВС, в основном, ограниченные α-спиральным фрагментом. Не вдаваясь в детали, заметим, что в данной структуре связь

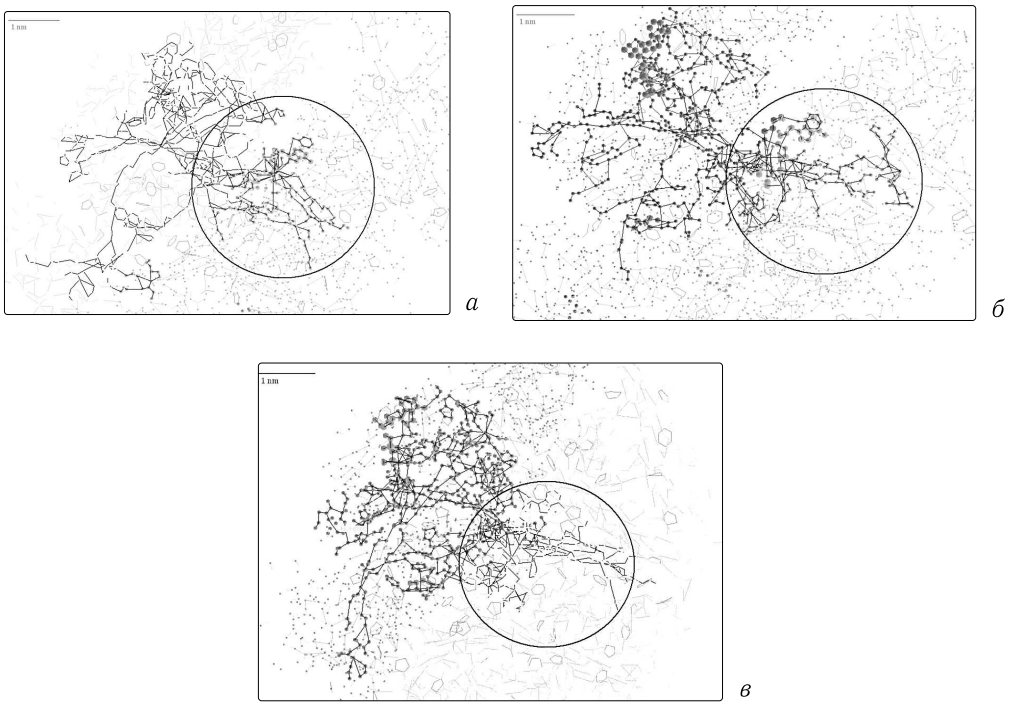


Рис. 10.14. Взаимосвязь субстратов через ССИВС в парах субъединиц F_1F_0-АТФ синтазы быка: *а* — субъединицы A+E; *б* — пара субъединиц B+F; *в* — субъединицы C+D

субъединиц в комплексах осуществляется через атомы кислорода фосфатных групп β-субъединиц и N–C=N-группы аргининов, принадлежащих обеим субъединицам (в комплексе B-F - Arg 373B и Arg 189F). При этом резко увеличивается количество ССИВС, окружающих обе фосфатные группы. Это происходит как за счет того, что часть из них продолжается в соседней субъединице, так и за счет появления одиночных «вставочных» групп из соседней субъединицы, благодаря которым становится возможным продолжение ССИВС в исходной субъединице. Аналогичные пары связанных через ССИВС субстратов найдены для файлов 1E1R (пары B+F, C+D) и для 1WOJ (пара C+D).

В то же время, в файле 1E1Q практически все субстраты оказались не связаны через ССИВС, хотя и наблюдается переход ССИВС из одной субъединицы в другую. В файле 1OHH наблюдается иная картина — субстраты субъединиц F, C и D оказались связанными через ССИВС, а субстраты субъединиц A, E и B — изолированы. Учитывая, что разрешение в этих структурах составляет порядка 2,8 Å, то пока к этим данным нужно относиться с осторожностью.

Таким образом, на приведенных примерах мы показали, что как и в случае с алкогольдегидрогеназой, в структуре F_1F_0-АТФ синтазы быка наблюдаются такие элементы нашей модели как связь субстратов с ССИВС и взаимосвязь активных центров субъединиц через ССИВС. Дальнейшее углубление в механизм действия этого фермента требует, очевидно, постановки специальных экспериментов и выходит за рамки нашей работы.

10.3.4. Роль фосфатных групп как элементов, активирующих перенос зарядов в ССИВС надмолекулярных структур. Приведенная выше структура ССИВС F_1F_0-АТФ синтазы, связанная с синтезом и гидролизом АТФ, универсального донора зарядов, не является уникальной именно для этого фермента. Сходную структуру ССИВС, как мы убедились, имеют и другие АТФ-связывающие ферменты, например, АТФ-азные центры актина (1ATN), NH_3-зависимой НАД-синтетазы (1NSY), 3-фосфоглицераткиназы (1PHP), аденилаткиназы (2ECK), шоковых белков (1KAX) и многих других. Более того, близкую структуру имеют и ГТФ-азные центры так называемых G-белков (ГТФ-связывающих, в отличие от А-белков, которые связывают АТФ). Многие G-белки рассматриваются как сигнальные. На рис. 7–9 была приведена обобщенная схема ГТФ-азного центра таких белков как онкогенный белок человека (1grn), малая ГТФ-аза из тканей человека (1rrp), ГТФ-азный домен ГТФ-азы мозга крысы (3rab), трансдуцин альфа из ретинальной ткани глаза быка (1tad), сигнальный G-белок из тканей крысы (1aso). На этой схеме вместо конкретных цифр приведены буквы n и i. Подставляя вместо них значения, характерные для каждого из перечисленных белков (они даны в подписи под рисунком), можно перейти к конкретной структуре ГТФ-связывающего центра того или иного G-белка. Сопоставляя рис. 10.13 и 7.9 можно сделать вывод о том, что эти два типа нуклеотид-связывающих центров имеют близкую структуру ССИВС.

Обратим также внимание на рис. 10.7, на котором к O_2-атому O_1–P=O_2-группы НАД прикреплен протяженный участок α-спирали. Аналогичные спиральные фрагменты можно наблюдать в структуре и других дегидрогеназ. Протяженные ССИВС с участием HO–P=O-групп возникают также при фосфорилировании белков, при связывании с циклическим аденозинмоно-фосфатом (ц-АМФ), в структуре нуклеосом (см. раздел 7.3.2). Более того, молекулы фосфолипидов встраиваются своими HO–P=O-группами в структуру ССИВС электронно-транспортных белков (см. гл. 11).

Возникает естественный вопрос: каково функциональное значение такого встраивания HO–P=O-групп в структуру ССИВС. Нам представляется, что ответ на этот вопрос может дать рассмотрение особенностей электронной структуры HO–P=O-групп. Во-первых, атом кислорода этой группы связан с атомом фосфора за счет p_π-d_π связи, более высокоэнергетичной, чем обычная p_π-связь. Во-вторых, атом кислорода является в этой группе более электроотрицательным, чем в обычных HO–C=O-группах. И в третьих, атом водорода, присоединенный к HO–P=O-группе обладает большей подвижностью, чем в HO–C=O-группах (фосфорная кислота является более сильной, чем карбоновые кислоты). Все вместе взятое позволяет предположить, что HO–P=O-группы, встраиваясь в ССИВС, обладающую, как мы видели, кооперативными свойствами, придают большую подвижность входящим в них протонам и являются, по сути, как элементами, способными активировать процесс переноса зарядов в ССИВС. На наш взгляд, именно эти группы являются тем недостающим звеном, без которого идея переноса зарядов по ССИВС до сих пор не находила широкого распространения. Можно сказать, что без включения HO–P=O-групп в ССИВС многие процессы переноса зарядов в белках были бы просто неосуществимы. Отрицательный заряд, появившийся в результате расщепления одной из фосфатных групп в нуклеотидтрифосфатах, получает возможность свободно перемещаться по такой активированной ССИВС. В следующей главе будут представлены квантово-механические расчеты, проведенные на модельной структуре,

содержащей системы HO–P=O-групп, которые указывают на высокую подвижность протонов в таких системах и свидетельствую в пользу высказанных соображений.

Для специалистов, собирающихся разрабатывать функциональные структуры на основе ССИВС, высказанные соображения могут иметь принципиальную значимость. Необходимо учитывать возможность присоединения фосфатных групп к ССИВС отдельных блоков конструируемых структур, с тем, чтобы обеспечить их высокую функциональную активность.

10.4. «Флип-флоп»-механизм в биокатализе: гипотеза универсальности

В разделе 10.2.4 мы уже анализировали явление «реакционной способности половины от числа активных центров» и предложенный на его основе «флип-флоп»-механизм биокатализа. Однако, мы, как и в предыдущей монографии [3], посвящаем этому механизму специальный раздел, поскольку подобный наша модель катализа предполагает его принципиальную важность.

10.4.1. Объяснение «флип-флоп»-механизма с позиции модели катализа на основе ССИВС. Рассмотренные в разделе 10.2.4 физические механизмы, предложенные для объяснения явления реакционной способности половины от числа активных центров и связанные с представлениями о переносе зарядов и миграции энергии между активными центрами [45, 46] имеют ряд рациональных моментов, которые близки и нашей модели катализа. Так, в рамках нашей модели, это явление связано с тем, что в каждый данный момент времени перенос зарядов может осуществляться только в одном из направления (см. раздел 10.1.4). Вследствие этого возникает различие в реакционной способности одних и тех же групп, находящихся в разных активных центрах, которые обусловлены различным расположением на них протонов, одинарных и двойных связей (группы $HQ_1–R=X_1$ и $HX_1–R=Q_1$, показанные на рис. 10.3.). В этом смысле существование тиоловых групп, по-разному реагирующих с одними и теми же реагентами в креатинкиназе [47], может интерпретироваться не как асимметрия структуры, предполагаемая в [47], а как различные состояния одних и тех же групп, обусловленные направленностью переноса зарядов.

Этим же, с позиции модели, объясняется факт существования субстратов самоубийства ферментов (suicide substrates), реагирующих, как правило, с одним из двух активных центров и полностью инактивирующих при этом фермент [44]. Эти «субстраты», с точки зрения нашей модели, имеют, вероятно, такую электронную структур, которая нарушает механизм симметричного обращения переноса заряда по ССИВС. В результате вся внутренняя энергия, циркулировавшая по ССИВС поочередно между активными центрами фермента, расходуется на реакцию, идущую необратимо в одном активном центре. Фермент при этом как бы «деэнергизуется». Отметим, что подобные объяснения близки к идеям работы [45], однако по сравнению с ними наши объяснения носят более конкретный характер и увязаны как с механизмом катализа, так и с олигомерной структурой ферментов.

Новыми элементами нашей модели, при сопоставлении с существующими представлениями о катализе, являются:

— участие ССИВС в осуществлении взаимосвязи между активными центрами субъединиц (см. данные раздела 10.3), синхронизованные с переносом зарядов по

ССИВС и обусловленные этим переносом структурные изменения фермента. В нашей модели, как в работе [37], имеется два типа активных центров — открытые и закрытые, поочередно меняющиеся местами в процессе катализа (см. рис. 10.5);

— симметрия направлений переноса зарядов по ССИВС, определившая в процессе эволюции симметричную организацию олигомерных ферментов;

— поочередность работы активных центров.

Последняя особенность модели послужила основанием для предположения о том, что «флип-флоп» механизм имеет гораздо большее распространение в биокатализе, чем это до сих пор считается [1, 2].

10.4.2. Распространение «флип-флоп» механизма катализа в различных классах ферментов. Характерными признаками «флип-флоп» механизма катализа, описанными в разделе 10.2.4, являются отрицательная кооперативность в кинетике катализа, а также обратимое и необратимое связывание с половиной от числа активных центров. Эти признаки мы использовали в качестве критериев отбора при составлении таблицы ферментов, которые могут работать по этому механизму (табл. 10.1). В основу принципа построения таблицы положена Классификация ферментов [87]. Кроме перечисленных выше признаков, в таблице приведены: источник выделения фермента, количество входящих в структуру субъединиц, а также субстраты или ингибиторы, с помощью которых были выявлены эти признаки. Отметим, что количество изученных ферментов, где возможен данный механизм, значительно больше того, что включено в данную таблицу. Мы привели в ней лишь те ферменты, для которых возможность данного механизма осознается сами авторами исследований. Прототипом данной таблицы послужила таблица, приведенная в работах [2, 3], основу которой составили данные полученные в 80–90-е годы прошлого века. В тот период флип-флоп» механизм активно обсуждался, и имелось достаточно большое число публикаций. Мы дополнили ее современными публикациями (порядка 10 ссылок), количество которых с каждым годом, к сожалению, сокращается.

10.4.2.1. ***Оксидоредуктазы.*** Этот класс ферментов (класс 1.) является, по-видимому, одним из самых изученных в отношении «флип-флоп» механизма. В нашей таблице имеется 20 представителей этого класса, из которых 7 входит в подкласс 1.1, а 6 — в подкласс 1.2. К числу наиболее известных и изученных ферментов относятся алкогольдегидрогеназа (рассмотренная в разделе 10.3.2.) и D-глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа. Роль «флип-флоп» механизма в работе этого класса ферментов подробно рассмотрена в обзоре [176]. К числу важных и интерсных ферментов этого класса относятся убихинол цитохром с оксидоредуктаза (bc1 комплекс) и цитохром-с-оксидаза (см. разделы 4.1.1.3 и 4.1.1.4). Несмотря на сложный субъединичный состав, их свойства адекватно описываются с помощью «флип-флоп» механизма [108–110], хотя сторонники хемиосмоти-ческой концепции часто об этом скромно умалчивают. Для них факт существования этого механизма является одной из трудных и малопонятных проблем.

10.4.2.2. ***Трансферазы.*** Из 14 ферментов этого класса (класс 2.) в таблице нашли отражение лишь пядь подклассов (2.1, 2.2, 2.5, 2.6 и 2.7). Наиболее изученным в отношении «флип-флоп»-механизма можно считать подкласс трансаминаз (2.6.). Интересными особенностями в отношении этого механизма обладает фермент креатинкиназа, который, как утверждают авторы, является примером асимметричного димера [126]. Интерпретация этих данных с позиции нашей модели будет дана далее.

Таблица 10.1

Ферменты, в которых возможен «флип-флоп»-механизм катализа

№ п. п.	Индекс класс. ферм.	Наименование фермента	Источники выделения	Число субед.	Призн. фл.-фл. механ			Субстраты, аналоги субст, ингибиторы	Литература
					1	2	3		
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1. Оксидоредуктазы									
1	1.1.1.1	Алкогольдегидрогеназа	Печень лошади	2	+		+	пиразол-НАД$^+$-ферм. комплекс	[59]
					+		+	ароматич. альдегид-ные субстр.	[60]
					+		+	р-нитрозо-N,N-диметиланилин	[61]
					+		+	р-трифтор-(F^{19})-метильные производные бензил. спирта, бензальдегида, бенз. к-ты	[62]
2	1.1.1.22	Уридинфосфатглюко-зоизо-мераза	Печень быка	6	+		+	иодуксная к-та, иодоацетамид	[88]
					+	+		6,6′-дитионитио-никотин. к-та	[89]
3	1.1.1.37	Малатдегидрогеназа	Митох. сердца свиньи	2	+			Оксалоацетат	[63]
			Цитопл. серд. мышцы	2		+		НАД$^+$ в крист. ферм.	[64]
4	1.1.1.40	Малатдегидрогеназа	Печень голубя	4	+	+		Связыв. с Mn^{2+}	[65]
					+		+	бромпируватом,	
					+			L-малатом	
5	1.1.1.44	6-фосфоглюконат-дегидрогеназа	Candida utilis	2	+		+	Периодатн. аналог НАДФ и 3-амино-пиридин-аденин-нуклеотид в прис. 6-фосфоглюоната	[90]
6	1.1.2.3	L-лактатдегидрогеназа	Дрожжи		+			Связ. с цитохром. *c*	[91]
7	1.1.3.13	Алкогольоксидаза	Candida boidinii	8	+		+	Циклопропанон-1 гидрат	[92]

Таблица 10.1 (*продолжение*)

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
8	1.2.1.3	Альдегид дегидрогеназа	Митохондрии печени крыс	2	+			НАД (+)	[93]
9	1.2.1.10	Аспартат-β-полуальдегиддегилрогеназа	E.coli	2			+	L-2-амино-4-оксо-5-хлор-пентан. к-та	[94]
10	1.2.1.12	D-глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназа	Мышцы крыс	4			+	1-фтор-2,4-динитро-бензол	[67]
			Мышцы кролика	4			+	β-(2-фурил)-акрилоилфосфат	[68]
					+	+		$НАД^+$, никотин-амид-1,N^6-этено-адениндинуклео-тид	[69]
					+		+	ω-(3-бромацетил-пиридино)-алкилди-фосфоаденозины	[95]
			Мышцы осетра	4	+		+	Флуориметр. титр. $НАД^+$ и НАДН β-(2-фурил)-акрилоилфосфат	[96, 97]
			Дрожжи	4			+	β-(2-фурил)-акрило-илфосфат,флуоро-нитробензол, иодо-ацетат, иодоацет-амид	[70]
11	1.2.4.1	Пируватдегидрогеназа	Почки и сердце быка	$(\alpha\beta)_2$			+	Фосфорилир.OH-гр. серина в α-субъед.	[98]
			Грудная мышца голубя	$(\alpha\beta)_2$		+		2-гидрокситиамин-пирофосфат	[99]
12	1.2.4.2	α-кетоглутаратдегидрогеназа	Мышцы голубя	2	+		+	Диэтилпирокабонат в присутст. α-кето-глутарата	[100]
13	1.2.4.3	Глютаматдегидрогеназа	Печень быка	6	+		+	L-глютамил-α-хлор-метилкетон	[101]
					+	+		Тиоаналоги коферм. $НАД^+$ и $НАДФ^+$	[102]

Таблица 10.1 (*продолжение*)

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
14	1.4.3.4	Моноаминооксидаза	Печень быка	2	+		+	Транс-фенилцикло-пропиламин в отсут. субстратов	[103]
			Митохондрии почек быка	2		+		Паргилин(N-бензил-N-метил-2-пропил-амин)	[104]
15	1.6.1.1	Никотинамид нуклеотид трансгидрогеназа	Митохондрии животных	2			+	5′-[р-(фторсульфо-нил)бензоил] адено-зин	[105]
			Rhodospirillum rubrum	2	+			Два типа асимметр. связывания НАДН	[106]
16	1.8.–.–	Метил-коэнзим М редуктаза	Methanothermobacter marburgensis	$(\alpha\beta\gamma)_2$	+			Связыван. коэнзима М и коэнзима В	[107]
17	1.9.3.1	Цитохром-*c*-оксидаза	Сердце быка	2	+		+	Арилазидцитохр. *c*, модифиц. по Lys-13	[108]
				$(\alpha_1, \alpha_3)_2$	+	+		Цитохром *c*	[109]
18	1.10.2.2	Убихинол цитохром с оксидоредуктаза (bc1 комплекс)	Митохондрии дрожжей, мутантный штамм	2		+		миксотиазол	[110]
19	1.11.1.9	Глютатионпероксидаза	Эритроциты быка	2 $(\alpha\beta)_2$	+	+		Мечен.H^3-глютати-он в крист. фермен.	[111]
20	1.17.4.1	Рибонуклеотидредуктаза	E. coli	$(\alpha\beta)_2$	+			Распределен. радик. Туг-122 в димере из малых субъединиц	[112]
2. Трансферазы									
21	2.1.3.2	Аспартаткарбамоил-трансфераза	E. coli	6	+	+		Сукцинат в отсутст. карбамоилфосфата, карбамоилфосфат в отсутствие сукцината	[113]
22	2.1.1.45	Тимидилатсинтетаза	Lactobacillus casei	2	+		+	Связыван. ост. Arg с фенилглиок-салем	[114]

Таблица 10.1 (*продолжение*)

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
23	2.2.1.1	Транскетолаза	Дрожжи Saccharomyc. cerevisiae	2	+			Связывание тиамидифофосфата	[115]
24	2.2.1.2	Трансальдолаза	Candida unilis	2	+	+	 +	Дигидроксиацетон Фотоокисление ост. His	[116] [117]
25	2.5.1.18	Глютатионтрансфераза гетеродимер A1-1	человек	2	+			7 субстр., представ. 3 типа реакц., катализир. ферм.	[118]
26	2.6.1.1	Аспартатаминотрансфераза	Митохондрии сердца кур Цитозоль сердца кур	2 2	+ +	+ +		2-оксоглютарат, аспартат, 2-оксоглютарат, аспартат	[119] [120]
27	2.6.1.2	L-аланинтрансаминаза	Сердце свиньи	2	+		+	L-пропаргилглицин	[121]
28	2.6.1.16	Глюкозаминсинтетаза	E. coli	2			+	6-диазо-5-оксо-L-норлейцин в отсут. фруктозо-6-фосфата	[122]
29	2.6.1.19	4-аминобутиратаминотрансфераза	Мозг свиньи	2	+	+		Пиридоксаль-5′-фосфат	[123]
30	2.6.1.53	Глютаматсинтетаза	E. coli	$(\alpha\beta)_4$	+	+		2-оксоглютарат в отсут. глютамина	[124]
31	2.7.1.30	ATP-глицеро-3-фосфотрансфераза (глицеролкиназа)	E. coli	4	+			АТФ, фруктозо-1, 6-дифосфат	[125]
32	2.7.3.2	Креатинкиназа	Мышцы кролика Митохондр. сердца быка	2 2	+ +		+	2-нитро-5-тиоциа-натбензойная к-та 2,4-динитрофенил-тиоцианат 2,3-бутадион	[126] [47] [127]

Таблица 10.1 (*продолжение*)

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
33	2.7.7.6	РНК-полимераза	E. coli	2		+		т-РНК	[128]
34	2.X.X.X	Гистидин протеинкиназа хемотакс. (CheA)	S. typhimurium	2	+			фосфорилирование	[129]
3. Гидролазы									
35	3.1.1.4	Фосфолипаза A_2	Яд гобры	2	+		+	р-бромфенацил-бромид	[130, 131]
36	3.1.1.32	Фосфолипаза А	Наружная мембрана Enterobacter agglomerans	2			+	1-р-нитрофенил-октилфосфонат-2-тридецилкарбамо-ил-3-ет ханесуль-фониламино-3-деок-си-sn-глицерин	[132]
37	3.1.2.14	Ацил-АПБ-специфичн. тиоэтераза	Thermus thermophilus HB8	4	+			Производные коэнзима А	[133]
38	3.1.3.1.	Щелочная фосфатаза	E. coli	2	+	+		$P_{н.}$ в кислой и щел. среде	[39]
39	3.3.1.1.	S-аденозилгомоцистеиназа	Lupinus luteus	2	+	+		Аденозин	[134]
40	3.5.3.6	Аргининдеаминаза	Mycoplasma arthridis	2		+		$[C^{14}]$-аргиниларги-нин	[135]
41	3.6.1.1	Неорганическая пирофосфатаза	Sacharomyces cerevisiae	2	+	+		$P_{н.}$ в присут. Mg^{2+}	[136]
42	3.6.1.35	H^+-аденозинтрифосфатаза	Митохондрии сердца быка	2	+	+		$[O^{18}]$-ATP	[137]
				$(\alpha\beta)_2$		+		2,3-O (2,3,4-тринит-рофенил)-аденозин-5 $[\gamma\text{-}^{32}P]$-трифосфат	[138]
							+	Ковалентная модиф. фотоаф.аналог. ATP	[139]
			Хлоропласты шпината	2	+	+		ADP, ATP, свет	[140]
				$(\alpha\beta)_2$	+		+	Тринитробензол-сульфонат, свет	[141]

Таблица 10.1 (*продолжение*)

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
43	3.6.1.37	Na,K-аденозинтрифосфатаза	Почки млекопитающих	2 $(\alpha\beta)_2$	+ +	+	 +	ATP, Na^+, Mg^{2+} Va^{2+}	[142, 143] [144]
44	3.6.1.38	Ca-аденозинтрифосфатаза	Мышцы кролика	2	+	+		ATP, Mg^{2+}, Ca^{2+}	[145, 146]
4. Лиазы									
45	4.1.1.1	Пируватдекарбоксилаза	Пивные дрожжи	4	+		+	(E)-4-(4-хлорфе-нил)-2-оксо-3-бутеновая кислота	[147]
46	4.1.1.4	Ацетоацетатдекарбоксилаза	Clostridium acetobutilicum	12			+	Ацетопируват, Уксусный ангидрид, 2,4-динитрофенол	[148] [149]
47	4.1.2.13	Фруктозо-1,6-дифосфатальдолаза	Мышцы кролика	4			+	Дигидроксиацетон-фосфат	[150]
48	4.1.3.12	α-изопропилмалатсинтаза	Salmonella typhimurum	4		+		α-кетоизовалерано-ваяктавостсут. сусбстрата-пропионил-КоА	[151]
49	4.2.1.24	Дегидратаза 5-аминоле-вулиновой к-ты	Печень быка	8			+ +	5-хлорлевулиновая к-та, 3-хлорлевулин. к-та Ala-зависимая инактивация NaBH4	[152] [153]
50	4.4.1.11	Метионин-γ-лиаза	Pseudomonas ovalis	4			+	[α^{14}C]-пропаргил-глицин	[154]
5. Изомеразы									
51	5.3.3.1	Δ^5-3-оксостероидизоме-раза	Pseudomonas testosteroni	2		+		Аналоги половых гормонов	[155]
52	5.4.99.2	Малонил-Коа-мутаза	Фибробласты человека	2	+	+		Аднозилкобаламин	[156]

Таблица 10.1 (*продолжение*)

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
6. Синтетазы									
53	6.1.1.1	Тирозил-т-РНК-синтетаза	E. coli	2	+	+		т-РНК, тирозин, тирозиладенилат	[157]
			Bac. stearotermophilus	2		+		аминоациладенилат	[158]
54	6.1.1.2	Триптофанил-т-РНК-синте-таза	Поджелудочная железа быка	2	+	+		Триптофаниладени-лат	[159]
							+	Смешанный ангид-рид AMP и мезити-ленкарбоновой к-т в присут. триптофана	[160]
55	6.1.1.5	Изолейцил-т-РНК-синтетаза	E. coli	1, но 2 а. ц.	+			Иле, ATP, т-РНК	[161]
56	6.1.1.9	Валил-т-РНК-синтетаза	Bac. stearotermophilus	1, но 2 а. ц.	+			Вал, ATP	[162]
57	6.1.1.10	Метионил-т-РНК-синтетаза	E. coli	4	+	+		Метионин, метио-нинаденилат, т-РНК	[163]
58	6.1.1.20	Фенилаланил-т-РНК-синтетаза	E. coli	$(\alpha\beta)_2$	+	+		Фенилаланин в при-суст. т-РНК	[164]
			дрожжи	$(\alpha\beta)_2$	+	+		Фенилаланин	[165]
59	6.1.1.21	Гистидил-т-РНК синтетаза	E. coli	2			+	аналог АТФ 5′-[р-(фторсульфонил) бензоил] аденозин	[166]
60	6.2.1.5	Сукцинаттиокиназа	E. coli	$(\alpha\beta)_2$	+			Сукцинат, ATP, КоА	[167]
61	6.2.1.9	Малаттиокиназа	Pseudomonas M. A.	$(\alpha\beta)_4$	+		+	Фосфорилирование ATP после обработ. метоксикарбонил-КоА-дисульфидом	[168]

Таблица 10.1 (*окончание*)

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
62	6.3.1.2	Глютаминсинтетаза	E. coli	12	+		+	Метионинсульфокс-имин, ATP	[169]
			S.cerevisiae	8			+	Метионинсульфокс-имин, ATP	[170]
			Печень крыс	8			+	Метионинсульфокс-имин	[171]
63	6.3.4.2	Цитидинтрифофат-синтетаза	E. coli	4			+	6-диазо-5-оксонор-лейцин	[172]
64		Синтетаза жирных кислот	Дрожжи	$(A_3 B_3)_2$			+	[14C]-иодацетамид	[173]
			Молочная железа крыс	$(A_3 B_3)_2$	+		+	S-(4-бром-2,3-ди-тиобутил)-КоА	[174]
						+		Синтез 1 моль паль-митиновой к-ты на димер	[175]

Признаки «флип-флоп»-механизма: 1 — отрицательная кооперативность; 2 — обратимое связывание 1/2 активных центров; 3– – необратимое связывание 1/2 активных центров.

10.4.2.3. *Гидролазы.* В нашей таблице представлено 10 ферментов этого класса (класс 3.), из которых четыре относятся к подклассу гидролаз ангидридов кислот (подкласс 3.6.). Предсталяется удивительным, что практически ни для одного из ферментов обширнешего подкласса пептидгидролаз (подкласс 3.4.) «флип-флоп»-механизм не показан. Одним из первых ферментов, для которых бл предложен этот механизм, явилась щелочная фосфатаза (ЕС 3.1.3.1). Особенностью неорганической пирофосфатазы (ЕС 3.6.1.1) явялется обнаружение «флип-флоп»-механизма фосфорилирования субъединиц в некаталитическом центре [136]. Важным мембранным ферментом, для котрого был предложен «флип-флоп»-механизм (по терминологии авторов — попеременнсти мест связывания) является H^+-АТФ-аза [137–139]. И хотя в настоящее время обсуждается «ротационный» механизм синтеза АТФ (см. раздел 4.1.1.5), учитывая принципы нашей модели, нельзя исключить и элементы «флип-флоп»-механизма в работе этого фермента (см. раздел 10.3.3). Тем более, что этот механизм оказался применим и к другим АТФ-азам — Na^+, K^+ и Ca^{++}-зависимым [142–146].

10.4.2.4. *Лиазы.* Шесть представителей этого класса ферментов осуществляют реакции не гидролитического отщепления различных групп — декарбоксилирования, дегидратирования. Обращает на себы внимание наличие в этой группе ферментов с большим числом субъединиц — 12 у ацетоацетатдекарбоксилазы (4.1.1.4), 8 — у дегидратазы 5-аминолевулиновой кислоты (4.2.1.24), по 4 — у остальных ферментов. Тем не менее, в процессе инактивации эти ферменты ведут себя как функциональные димеры и проявляют «реакционную способность половины от числа активных центров».

10.4.2.5. *Изомеразы.* Этот класс ферментов (5.) является наименее изученным в отношении «флип-флоп»-мезанизма. В нашей таблице приведены лишь два его представителя. При этом необходимо отметить, что наличие «реакционной способности половины от числа активных центров» в ферменте Δ^5-3-оксистероид-изомеразе, обнаруженное в работе [155] было предметом острых дискуссий [177]. В то же время данные, полученные на метил-малонил-КоА-мутазе, носят косвенный характер.

10.4.2.6. *Лигазы.* Как и оксидоредуктазы, ферменты класса лигаз (класс 6.) относятся к числу наиболее изученных в отношении «флип-флоп»-механизма. В нашей таблице представлено 12 ферментов, причем более половины из них (7 ферментов) относятся к группе аминоацил-т-РНК синтетаз. Как правило, для осуществления синтеза связей большинство лигаз требуют участия макроэргических соединений (обычно АТФ). Для многих аминоацил-т-РНК синтетаз было показано более тридцати лет назад, Представляет интерес. Что некоторые из них (6.1.1.5, 6.1.1.9.) являются мономерами. Однако детальное их изучение [161, 162] выявило наличие в их структуре двух ковалентно связанных идентичных аминокислотных последовательностей, а кинетические исследования показали наличие двух активных центров. Так что фактически они являются димерами [162]. Для ряда ферментов этой группы (6.1.1.20, 6.2.1.5, 6.2.1.5) характерно наличие α и β субъединиц, присутствующих в ферменте в четном количестве. Комплекс $\alpha\beta$ работает при этом как единая функциональная структура. К числу подобных комплексных ферментов относится и синтетаза жирных кислот, также включенная нами в таблицу. Несмотря на большое число стадий, осуществляемое этим ферментом, она ведет себя как димер: при взаимодействии с ^{14}С-иодацетамидом инактивируется только три из шести

«периферических» SH-групп [173], на ферменте синтезируется одновременно только одна жирная кислота [175]. Последний результат, однако, явился предметом острой дискуссии [178]. Следует также отметить, что существуют также обоснованные гипотезы относительно двухфазного механизма работы и других сложных структур, в частности, в комплексах сократительных белков [179].

10.4.3. Экспериментальные доказательства в пользу физической реальности «флип-флоп» механизма. Как мы уже упоминали (раздел 10.2.4.), первоначально флип-флоп»-механизм катализа являлся лишь удобной моделью для описания совокупности ряда свойств ферментов [180]. К настоящему времени имеются экспериментальные данные как чисто биохимического, так и структурного характера, которые можно трактовать в пользу физической реальности поочередной работы активных центров олигомерных ферментов.

С помощью радиоактивного аналога АТФ — 2,3-O-(2,4,6-тринитрофенил) аденозин-5'[γ^{32}P]-трифосфата (TNP-ATP) на митохондриальной АТФ-аза сердца быка было проведено заполнение одного из гидролитических участков этого фермента, причем образующийся комплес характеризовался низкой скоростью гидролиза субстрата [138]. Последующее добавление избытка нерадиоактивного TNP-ATP в концентрации, достаточной для заполнения второго каталдитического участка на ферменте приводило к ускорению скорости гидролиза радиоактивного субстрата в 15–20 раз. Эти наблюдения являются прямым доказательством в пользу кооперативного взаимодействия между активными центрами Н-АТФ-азы. А если принять во внимание приведенные в разделе 10.3.3 структурные данные по ССИВС, связывающих активные центры α- и β-субъединиц, то эти же данные можно интерпретировать в пользу участия ССИВС в этих взаимодействиях.

В работе [181] на другом ферменте, сукцинил-КоА-синтетазе, было показано, что если использовать гибридный фермент $\alpha^{*}\beta\ \alpha^{P}\beta$, содержащий α^{*}-субъединицу, меченную по ^{35}S, и α^{P}-субъединицу с нерадиоактивным фосфатом, что после короткого действия субстрата (АТФ) обе субъединицы стали содержать фосфатную группировку. Этот результат однозначно показывает, что оба активных центра участвуют в катализе и не существует постоянной асимметрии молекулы фермента. Тем самым давний спор о существовании лиганд-индуцируемого кооперативного перехода [70, 182] и предсуществующей асимметрии, т. е. изначальной не идентичности субъединиц [183], вышеприведенными экспериментами решается в пользу первого.

Современные структурные данные также могут служить доказательством в пользу физической реальности явления реакционной способности половины от числа активных центров и основанного на нем «флип-флоп»-механизма. Так, в работе [185] проводится анализ структурной асимметрии субъединиц аспартат бета-полуальдегиддегидрогеназы E. coli. Авторы связывают эту асимметрию с механизмом реакционной способности половины от числа активных центров.

В структуре АДГ-Л (раздел 10.3.2.6, файл 3BTO) выявлена существенная асимметрия состояний ССИВС, существующая в одной из пар субъединиц этого фермента. В близком по каталитическим свойствам ферменте циннамил алкогольдегидрогеназе Sacharomyces cerevisiae (ScAdh6p [184]) молекулы белка представляют собой структурные гетеродимеры, в которых одна субъединица находится в apo, а другая — в holo конформации, т. е. в конформации не связанной и связанной с кофактором. Флуориметрический анализ связывания НАДФ подтвердил, что с димером связыва-

ется только одна молекула кофактора. Поэтому авторы делают вывод, что ScAdh6p, по-видимому, функционирует в соответствии с механизмом реакционной способности половины от числа активных центров. При этом на основании полученных данных они склоняются к идее, что в димере имеется предсуществующая (до связывания кофактора) тенденция к структурной асимметрии. С этим выводом можно вполне согласиться. В нашей модели катализа, вследствие асимметричного в каждый данный момент времени расположения протонов в ССИВС и определенного направления переноса зарядов возникает неравнозначность свойств каждой из субъединиц. В этом плане показательным может быть фермент креатинкиназа, который, как утверждают авторы, является примером асимметричного димера. В нем одни и те же SH-групп в разных субъединицах обладают различной реакционной способностью [126]. Эти различия могут быть объяснены исходя из упомянутых выше особенностей нашей модели катализа.

Приведенный в этом разделе материал позволяет сделать следующие выводы:

1. Не существует специфической принадлежности «флип-флоп»-механизма к какому-либо одному или нескольким классам ферментов (см. табл. 10.1).

2. Имеющиеся экспериментальные данные указывают на физическую реальность «флип-флоп»-механизма.

Приведенные данные, в сочетании с разработанной нами моделью ферментативного катализа на основе ССИВС позволяют сформулировать следующую гипотезу: «флип-флоп»-механизм катализа является универсальным в работе всех ферментов.

10.5. Происхождение олигомерных ферментов и проблемы биогенеза

Из общетеоретических соображений можно утверждать: чтобы полностью понять изучаемый объект нужно знать не только принципы его построения и работы, но и представлять пути его возникновения и развития. Именно поэтому, для большей полноты охвата объекта, мы обратились в последнем разделе к вопросам возможного происхождения олигомерных ферментов. Эти вопросы, на наш взгляд, необходимо рассматривать вместе анализом проблем биогенеза, поскольку ферменты являются элементарными (в смысле неделимости) молекулярными функциональными устройствами и занимают самый нижний уровень в иерархической организации живых систем. Анализ возможных путей происхождения олигомерных ферментов может быть ключевым и для решения многих вопросов биогенеза.

Обсуждение проблем, связанных с происхождением ферментов, очевидно, может иметь и практический интерес. Биокатализаторы, как мы показали в начале этой главы, являются аналогами микропроцессоров. Можно надеяться, что идеи, связанные с анализом их происхождения, позволят наметить новые подходы к развитию молекулярной наноэлектроники.

Рассмотрение этих вопросов, в несколько «разукомплектованном» виде, уже проводилось в монографии [3]. Принципы эволюционного структурно-функционального подхода [186], сформулированные на основе концепции эволюционного катализа [187] и концепции ССИВС, на наш взгляд, не утратили своей актуальности и по настоящее время. Каких-либо принципиальных изменений с момента появления монографии [3] в нашей позиции не произошло, поэтому мы воспроизводим этот

анализ, с небольшими дополнениями, практически в неизменном виде, объединив его в один раздел.

10.5.1. Краткий обзор концепций биогенеза. Современный взгляд на литературу, посвященную проблемам биогенеза, позволяет выделить в ней два принципиально различных подхода — актуалистический и естественно-исторический [188]. Первый подход представляет собой проекцию наших знаний о природе биосистем из настоящего в прошлое. Такой подход позволяет осуществить реконструкцию путей становления особенностей живых систем. Его эффективность определяется уровнем развития современной биологической науки. Примерами концепций, развитых на основе этого подхода, являются: теория А. И. Опарина, рассматривающая эволюцию коацерватных капель из смеси высокомелекулярных биполимеров [189]; концепция химической эволюции М. Кальвина — модель автокатализа [190]; модель гиперцикла белок — нуклеиновая кислота М. Эйгена [191] и ряд других [192–194]. Актуалистические концепции анализируют, в основном, вопрос о том, как могла проходить химическая эволюция, какие соединения и в какой последовательности могли при этом возникать, но почти не затрагивают причинные аспекты этого процесса, приводящие к усложнению и развитию примитивных химических систем. Эти особенности химической эволюции освещаются в работах А. П. Руденко [187, 188, 195], который исходит из естественно-исторического подхода, основанного на анализе простейших объектов химической эволюции — элементарных открытых каталитических систем (ЭОКС). В разработанной концепции саморазвития ЭОКС автор выявил принцип их формирования на основе экзергонического процесса (базисной реакции), критерий существования и устойчивости неравновесных объектов, критерий отбора таких систем по наибольшей каталитической активности, основной закон химической эволюции, пределы саморазвития, их естественные этапы и ряд других закономерностей. Более углубленный анализ концепций биогенеза и процессов возникновения упорядоченных структур дан в работе [3]. Мы же сосредоточим внимание на изложении концепции эволюционного катализа, являющейся основой взглядов на происхождение олигомерных ферментов, развиваемых в настоящей работе.

10.5.2.1. ***Понятие элементарной открытой каталитической системы (ЭОКС) и ее основные характеристики.*** В основу развитой А. П. Руденко концепции эволюционного катализа [195], составной части общей теории химической эволюции, были положены многочисленные факты изменения свойств катализаторов (саморазработка, созревание, старение), происходящие в процессе их функционирования. Эти факты привели автора к разработке динамического подхода к явлению катализа, который предполагает наличие переменных свойств у всех основных параметров, являющихся постоянными в классическом катализе (природа, каталитическая активность и специфичность катализатора, механизм каталитического действия) [187].

Объектом химической эволюции является элементарная открытая каталитическая система (ЭОКС) [187, 188, 195], т. е. целостная совокупность катализатора, реагирующих веществ и продуктов во всех фазах каталитических актов, связанная в единый кинетический континуум (схема 10.3):

$$\mathrm{A} + \mathrm{B} + \ldots \rightarrow \left\{ \frac{\mathrm{A} + \mathrm{B} + \ldots \rightarrow \mathrm{C} + \mathrm{D} + \ldots}{\mathrm{K}_i} \right\} \rightarrow \mathrm{C} + \mathrm{D} + \ldots, \qquad (10.3)$$

где A, B, ..., C, D, ... — компоненты и продукты базисной каталитической реакции;

$$\left\{\frac{\mathrm{A}+\mathrm{B}+\ldots\rightarrow\mathrm{C}+\mathrm{D}+\ldots}{\mathrm{K}_i}\right\} \tag{10.4}$$

— каталитическая система; K_i — центр катализа, включающий в себя катализатор и другие внестехиометрические компоненты базисной реакции. Отметим, что понятие ЭОКС, как и многие введенные в науке понятия, является формализованной абстракцией. Однако именно его введение позволило автору проанализировать многие свойства эволюционирующих каталитических систем.

В качестве базисных реакций при образовании ЭОКС, и это очень существенно, могут служить лишь экзергонические реакции, т. е. обладающими отрицательным термодинамическим потенциалом (схема 10.4):

$$f=-\frac{\Delta G}{\alpha\cdot N_{\mathrm{A}}}\ [\text{Дж}], \tag{10.5}$$

где f — элементарное химическое сродство базисной реакции ΔG — потенциал Гиббса; α — коэффициент, зависящий от стехиометрии и механизма реакции; N_{A} — число Авогадро. Обмен веществ в ЭОКС характеризуется абсолютной каталитической активностью (схема 10.5):

$$a=n/t=q/t'>0\ [\mathrm{c}^{-1}], \tag{10.6}$$

где n — число каталитических актов за время t; t' — длительность одного каталитического акта. Условием существования ЭОКС как открытой каталитической системы и мерой ее динамической устойчивости является интенсивность обменного процесса «I» (схема 10.6):

$$I=a\cdot f\ [\text{Дж/с}]. \tag{10.7}$$

Произведение $a\cdot f>0$ является энергетическим потенциалом ЭОКС или общей мощностью базисной реакции, а $a\cdot f\cdot r$ — полезной мощностью, где r — к. п. д. базисного процесса [188]. В течение n каталитических актов в ЭОКС освобождается поток свободной энергии (схема 10.7):

$$E=a\cdot f\cdot n=A^2\cdot f\cdot t=a\cdot f\cdot n/t', \tag{10.8}$$

преобразующийся в поток бесполезно рассеиваемого тепла (Q) и полезной работы (θ). При этом $E=Q+\theta$, а $r=\theta/E$.

Согласно концепции, саморазвитие ЭОКС характеризуется величинами a, af и другими функциями от a, а самоорганизация ЭОКС — величинами θ, r и другими функциями от полезной работы базисного процесса внутри системы.

Тип устойчивости ЭОКС — динамический, т. е. целиком определяется обменом веществ и энергии, а не действием консервативных межмолекулярных сил. Сама ЭОКС предсталяет собой неделимый в фунциональном отношении объъект (структурно-энергетический континуум веществ и процессов) основой целостности которого является базисный процесс, а формой проявления — элементарный каталитический акт. Автором выделяется [188]: кинетическая сфера ЭОКС — обменные компоненты базисной реакции на всех стадиях механизма ее осуществления, и конституционная сфера — необменные, внестехиометрические компоненты базисной реакции (катализаторы, вспомогательные и структурирующие вещества со всеми особенностями их молекулярной и надмолекулярной структуры). ЭОКС могут испытывать воздействия

окружающей среды, затрагивающие как кинетическую сферу (например, умеренные температуры, небольшие изменения pH среды, концентрации реагирующих веществ), так и конституционную сферу (в частности, действие ионизирующего излучения, примесных реагентов и т. д.). В первом случае, после прекращения воздействия ЭОКС возвращаются к прежнему уровню стационарности, в то время как во втором случае могут произойти необратимые изменения катализатора (схема 10.8):

$$\mathrm{A}+\mathrm{B}+\ldots\rightarrow\left\{\begin{array}{c}\Phi\\ \downarrow\\ \mathrm{A}+\mathrm{B}+\ldots\rightarrow\mathrm{C}+\mathrm{D}+\ldots\\ \mathrm{K}_i\\ \downarrow\\ \mathrm{K}_i\end{array}\right\}\rightarrow\mathrm{C}+\mathrm{D}+\ldots, \tag{10.9}$$

В результате воздействия на конституционную сферу следующие варианты развития: каталитическая активность либо отсутствует ($a=0$), либо она имеется ($a>0$). При $a=0$ имеют место неэволюционные изменения, а ЭОКС прекрати свое существование, так как лишится источника энергии (базисного процесса). При $a>0$ мы будем иметь эволюционное изменение, а ЭОКС продолжит существование на новом уровне стационарности. В условиях многократных изменений в ходе базисной реакции сам по себе произойдет первичный отбор эволюционных изменений от неэволюционных, и будут выявляться цепи саморазвития ЭОКС:

$$\mathrm{K}_0\rightarrow\mathrm{K}_1\rightarrow\mathrm{K}_2\rightarrow\mathrm{K}_3\rightarrow\ldots\rightarrow\mathrm{K}_q, \tag{10.10}$$

так как базисная реакция может продолжаться лишь в случае эволюционных изменений при $a>0$.

Ряд ЭОКС, имеющих сходную базисную реакцию, согласно [188], будет формировать параллельные цепи эволюционных изменений:

$$\begin{array}{l}\mathrm{K}_{01}\rightarrow\mathrm{K}_{11}\rightarrow\mathrm{K}_{21}\rightarrow\mathrm{K}_{31}\rightarrow\ldots\rightarrow\mathrm{K}_{q1}\\ \mathrm{K}_{02}\rightarrow\mathrm{K}_{12}\rightarrow\mathrm{K}_{22}\rightarrow\mathrm{K}_{32}\rightarrow\ldots\rightarrow\mathrm{K}_{q2}\end{array} \tag{10.11}$$

При этом изменения $\mathrm{K}_i\rightarrow\mathrm{K}_{i+1}$ имеют смысл бифуркационных. В них затрагивается «параметр катастроф» — a, от которого зависит, будут ли эти изменеия катастрофическими или благоприятными для дальнейшего развития и существования ЭОКС.

Согласно [188], возможны два направления изменений природы ЭОКС:

— модифицирование механизма катализа при сохранении его сложности (за счет изменений состава и структуры катализатора);

— усложнение механизма (за счет дробления процесса на элементарные стадии и появления специальных катализаторов и систем их точного воспроизведения).

Последний механизм, по мнению А. П. Руденко, представляет собой динамическую многомерную фракталь, в которой каждая предыдущая форма механизма, в результате дробления при усложнении заменяется себе подобными элементами более сложного строения и высокого ранга. Целостность ЭОКС и генеалогическая связь все последующих форм с предыдущими при этом сохраняется.

10.5.2.2. ***Основной закон химической эволюции.*** В процессе эволюции, согласно [187, 188, 195], возможность длительного саморазвития каталитических систем определяется соблюдением следующих феноменологических принципов:

1. Статистический принцип. Развитие идет до тех пор, пока созраняется, после каждого эволюционного изменения $K_i \rightarrow K_{i+1}$ потенциальная возможность дальнейших изменений ($p > 0$).

2. Кинетический принцип. Эволюционные изменения должны сопровождаться изменениями параметра a — абсолютной каталитической активности. Параметр a никогда не должен уменьшаться до нуля.

3. Термодинамический принцип. Эволюционные изменения должны совершаться преимущественно как эндергонические превращения, сопряженные с базисной реакцией, причем в прогрессивной эволюции к. п. д. базисной реакции $r > 0$ и имеет тенденцию к возрастанию.

4. Генетический (информационный) принцип. При любом изменении $K_i \rightarrow$ $\rightarrow K_{i+1}$ должна существовать однозначная связь между изменениями каталитической активности и природой системы, благодаря которой обеспечивается запоминание информации. В ходе эволюции объем эволюционной информации должен возрастать. Это условие выполняется в результате неповторимости эволюционных изменений.

Нарушение сформулированных принципов приводит к прекращению эволюции ЭОКС и их деградации [187, 188, 195].

Эволюционные изменения ЭОКС подчиняются следующим физико-химическим принципам:

— необратимости изменений конституционной и кинетической сферы;

— сохранения структурной и функциональной сферы и неразрывности эволюционного процесса;

— энергетического сопряжения внутренних процессов во время работы ЭОКС;

— сохранения устойчивого неравновесного существования и развития.

Последний принцип является одним из наиболее существенных. В применении к биосистемам аналогичный принцип был сформулирован Э. Бауэром [196], что сближает последние с ЭОКС.

В процессе своего существования ЭОКС поддерживаю равновесие со средой (гомеостазис), причиной которого является самопроизвольное течение базисной реакции и ее полезная работа во внутренних процессах системы, направленных против равновесия. В этой связи необходимо отметить важность принципа энергетического сопряжения внутренних процессов. Благодаря существованию единого энергетического континуума в ЭОКС создается возможность сопряжения энергии базисной реакции ($f > 0$) с энергией эндергонических эволюционных изменений ($f_{i+1} < 0$). Общим условием осуществления этого процесса является следующее выражение (схема 10.10):

$$f + \sum_{(i)} f_i > 0, \quad f > \left[\sum_{(i)} f_i\right]. \tag{10.12}$$

Потенциально это обеспечивает возможность трансформации энергии базисной реакции в энергию химических связей и ее запасание в макроэргических связях молекул-аккумуляторов.

В работе [187] показано, что хотя вероятность положительных и отрицательных изменений абсолютной каталитической активности одинакова, в процессе эволюции

наибольшей вероятностью осуществления обладают цепи последовательных положительных изменений активности. Это является прямым следствием увеличения интенсивности базисной реакции и частоты каталитических актов при увеличении параметра a. На основании этого автор формулирует основной закон химической эволюции, который гласит: с наибольшей скоростью и вероятностью осуществляются те пути эволюционных изменений, на которых происходит максимальное увеличение абсолютной каталитической активности или же других свойств, зависящих от параметра a.

Изменения параметра a при реализации любых цепей эволюционных изменений ЭОКС подчиняется кинетическому закону (схема 10.11)

$$\overline{a}_i = a_0 \cdot \overline{k}_{\mathrm{g}}{}^j, \tag{10.13}$$

где a_0 — абсолютная каталитическая активность исходной системы; $\overline{a}_i$ — средняя активность после i-го эволюционного изменения; k_{g} — среднее геометрическое значение коэффициента развития, показывающего во сколько раз увеличивается или уменьшается каталитическая активность в одной эволюционной стадии; j — уровень развития ЭОКС на i-й стадии.

Эти изменения описываются в виде кинетических диаграмм [187, 188, 195]. Основной закон эволюции ЭОКС имеет вероятностный характер. Как показано в работе [187], устойчивость основного закона химической эволюции тем выше, чем больше осуществилось стадий эволюции q, чем больше термодинамический потенциал базисной реакции (сродство f), коэффициент развития k_{g}, элементарная вероятность эволюционного превращения в одном каталитическом акте p и чем выше к. п. д. базисной реакции r (схема 10.12):

$$\overline{\Theta}_{\mathrm{q}}(f, \overline{k}_{\mathrm{g}}, q, r, \overline{p}) = \frac{{a_0}^2 \cdot f^2 \cdot p^2}{2^{q-1} \cdot q} \sum_{\varepsilon=1}^{q-1} \sum_{j} {k^3}_{\mathrm{g}}{}^j \cdot q r_a. \tag{10.14}$$

Наряду с принципом саморазвития ЭОКС по параметру a, основной закон, как видно из схемы 10.12, устанавливает принцип самоорганизации по параметру r и принцип самоусложнения по параметру q, в общем виде характеризующему эволюционную информацию. Однако последние два подчинены первому, так как их проявление возможно только в связи с проявлением принципа саморазвития. Саморазвитие, самоусложнение и самоорганизация ЭОКС происходят за счет постоянного притока трансформируемой в ЭОКС энергии базисной реакции. Максимальные эволюционные преимущества получают при этом ЭОКС, развивающиеся на базе реакций с самым большим сродством (экзотермические реакции).

В работе [187] автор выводит ряд выражений, характеризующих степень организации эволюционирующих ЭОКС. При этом он подчеркивает, что вытекающее из этих выражений уменьшение энтропии организации в ходе эволюции связано не с уменьшением запаса энтропии в системе, а с повышением к. п. д. базисной реакции за счет совершенствования ЭОКС как молекулярной машины. Учитывая это, автор считает неудачными представления о таких разновидностях энтропии, предлагаемых для биоструктур, как «отрицательная энтропия» [197] и «негэнтропия» [198].

Существенно, что поскольку основной закон химической эволюции проявляется как отбор ЭОКС с наибольшей каталитической активностью, то изменения $\mathrm{K}_i \rightarrow \mathrm{K}_{i+1}$, происходящие в конституционной сфере (качественно переменные свойства

ЭОКС), имеют селективную ценность лишь в той степени, в какой они сказываются на качественно постоянных свойствах ЭОКС (параметрах a, af и др). Таким образом, изменения природы ЭОКС (качественно переменных свойств) поставляют материал для отбора, который осуществляется в процессе эволюции по единственному критерию — абсолютной каталитической активности [188].

10.5.2.3. ***Пределы развития ЭОКС и пути их преодоления.*** Согласно [187, 188, 195], саморазвитие ЭОКС — не беспредельный процесс и ограничено пределами вероятностного и кинетического характера. Вероятностные пределы связаны с особенностями катализаторов, формирующих ЭОКС, и внешней среды и определяются числом потенциально возможных необратимых изменений. Кинетические пределы связаны с постоянным уровнем температуры при эволюции (I кинетический предел) и органиченностью концентрации компонентов (II кинетический предел). При достижении какого-либо из пределов эволюция прекращается и возникает тупиковая форма. При напличии потенциальных возможностей формирования новых свойств у ЭОКС пределы преодолеваются, и химическая эволюция продолжается, пока не достигнет нового предела. По характеру преодолеваемых пределов химическая эволюция делится на две области: первичная химическая эволюция и предбиологическая эволюция.

Первичная химическая эволюция. На этом этапе, согласно [188], саморазвитие ЭОКС происходит в результате преодоления вероятностных пределов, т. е. вероятность изменений в структуре ЭОКС $p > 0$. При этом параметр отбора a_i изменяется лишь количественно, оставаясь качественно неизменным. Предполагается, что на этом этапе совершается переход от неорганических катализаторов к органическим, сопровождающийся фрактальным усложнением механизма синтеза катализаторов промежуточных стадий, а также последовательный переход к микрогетерогенным ЭОКС с границей раздела фаз. Заканчивается первичная химическая эволюция достижением I кинетического предела (температурного) (схема 10.13):

$$\lim_{v_\mathrm{p} \to w_\mathrm{d}} a_0 \cdot {k_\mathrm{g}}^{j\,\max} = \mathrm{const}\,. \tag{10.15}$$

При этом скорость расхода компонентов v_p приближается к скорости диффузии из среды w_d. Существование ЭОКС на этом уровне продолжается, однако дальнейшее их развитие прекращается.

Предбиологическая эволюция. Единственной формой преодоления I кинетического предела является приобретение ЭОКС способности к однородному росту с умножением числа каталитических функций, что приведет к росту абсолютной каталитической активности пропорционально их числу λ. Кинетический закон развития приобретает при этом вид (схема 10.14):

$$\lim a_{i\lambda} = a_0 {k_\mathrm{g}}^{j\,\max} \cdot \lambda. \tag{10.16}$$

Эта способность, согласно [188], может возникнуть лишь в результате развития систем матричного синтеза и репликации катализаторов и других внестехиометрических компонентов кинетического континуума на этапе эволюции микрогетерогенных систем. Это свойство ЭОКС идентично функции роста живых организмов.

При достижении II кинетического предела, когда ограниченность ресурсов питания в пределах ближайшего окружения не позволяет выйти за рамки определенного

объема, существование систем продолжается на уровне производительности (схема 10.15):

$$\lim_{\lambda\zeta=s-s'} a_{i\lambda} = a_0 k_g j \max \cdot \lambda_{\max} = \text{const}, \tag{10.17}$$

где s — поверхность ЭОКС; ζ — эффективность зоны питания одной каталитической функции; s' — не занимаемые зонами питания участки поверхности.

Однако на этом этапе развитие не происходит, так как для проявления основного закона необходим рост производительности $a_{i\lambda}$, которая стала постоянной. Единственной формой преодоления II кинетического предела является появление способности к точной пространственной редупликации ЭОКС в целом, т. е. функции размножения. С этого момента предбиологическая эволюция переходит в биологическую.

Биологическая эволюция. Кинетический закон для ЭОКС, приобретших способность к самоудвоению, будет следующим (схема 10.16):

$$a_{i\lambda\nu} = (a_0 {k_g}^{j\max} \cdot \lambda_{\max}) 2^{\nu}, \tag{10.18}$$

где ν — число поколений в популяциях самовоспроизводящихся ЭОКС между последующим и предыдущим эволюционным изменением; $a_{i\lambda\nu}$ — производительность популяции ЭОКС.

При этом возрастает объем питания, увеличивающийся с каждым делением, увеличивается производительность популяции, продолжает действовать основной закон эволюции и механизм отбора по качественно новому параметру $a_{i\lambda\nu}$. Появление у ЭОКС способности к самовоспроизведению является переходом от предбиологической эволюции к биологической, переходом от неживых ЭОКС к простейшей живой системе.

Необходимо отметить, что существование перечисленных пределов развития является объективной закономерностью и вследствие этого развитие ЭОКС оказывается строго детерминированным. Свойства и функции ЭОКС, согласно работам [187, 188, 195], развиваются и формируются последовательно, причем преждевременное возникновение новых свойств ЭОКС до приобретения эволюционно предшествующих обрекает такие ЭОКС на гибель. Принцип последовательного формирования все более сложных свойств и функций на разных этапах химической эволюции, впервые сформулированный для процессов предбиологической эволюции Дж. Берналом [199], дает возможность фундаментального обоснования всех свойств и функций живых организмов, биохимических механизмов и специфических закономерносей биологической эволюции на основе общей концепции химической эволюции биогенеза [188].

Происхождение надмолекулярных структур. Процесс развития этих структур автор представляет как последовательный переход от простых ЭОКС с одноактным механизмом базисного процесса к сложным. В сложных ЭОКС функционирует многомолекулярная система катализаторов и вспомогательных веществ, которые связаны в единое целое надмолекулярным структурированием. На всех этих стадиях и простые и сложные ЭОКС (в том числе и живые организмы) существуют как кинетические континуумы взаимодействующих и взаимосвязанных веществ и реакций. При зхамене одностадийного протекания базисной реакции многомтадийным появляются цепи в сети последовательных, параллельных и сопряженных реакций. От структурно разобщенных систем совершается последовательный переход к образованию оболочек типа мембран, связанный с концентрированием нужных веществ,

сокращением путей перемещения промежуточных продуктов и их упорядочиванием. При этом появляется микрогетерогенность, возникает граница раздела фаз между ЭЛКС и средой, и ЭОКС приобретают форму шарообразных везикул [188].

10.5.3. Популяционно-матричная модель формирования олигомерных ферментов. Отсутствие в концепции эволюционного катализа конкретных представлений об основных принципах построения надмолекулярных биоструктур и механизмах переноса зарядов в них не позволяет перейти к дальнейшей конкретизации путей их возникновения и развития. Эти вопросы, на основе концепций эволюционного катализа и ССИВС были разработаны нами в работах [3, 200, 201].

10.5.3.1. ***Понятие элементарной дуплицированной открытой каталитической системы (ЭДОКС).*** Сформулированные в разделе 10.1 принципы модели катализа олигомерными ферментами на основе ССИВС, могут быть реализованы на основе дуплицированных структур, обладающих симметрией и работающих в режиме «флип-флоп». Основные элементы этой модели находят подтверждение в структуре реальных ферментов (раздел 10.3.) и в механизме их работы (разд. 10.4.). Такие структуры могут служить тем «идеалом», к которому шла эволюция примитивных ферментов. Чтобы этот процесс мог осуществляться, необходимо предположить, что развитие ЭОКС как органических катализаторов осуществлялось исходно на основе дуплицированных структур, не обладавших на первых порах той степенью совершенства, которой обладают современные олигомерные ферменты. В нашей модели мы будем именовать их как элементарные дуплицированные открытые каталитические системы (ЭДОКС), обладающие всеми свойствами ЭОКС, полюс дуплицированной структурой. Эта особенность придает им ряд новых свойств, в первую очередь связанных со своеобразием способа их существования и механизмом совершенствования.

10.5.3.2. ***Исходные условия формирования ЭДОКС.*** В настоящее время не представляется возможным полностью представить условия для формирования ЭДОКС. Скажем только, что основу их организации должны были составлять линейные цепные полимеры неупорядоченного состава, содержащие *рацемическую* смесь мономерных звеньев, близких по структуре к аминокислотам. Возможность возникновения полимеров, содержащих пептидные связи, подтверждается в самых различных подходах, моделирующих предбиологический этап эволюции [193, 194]. Не исключается также, что они могли возникнуть как результат использования энергии базисного процесса на определенном этапе развития различных ЭОКС. При этом полимеры могли как включаться в структуру ЭОКС, так и формировать *независимо от них* способные к эволюции каталитически активные дуплицированные структуры. Каким бы ни был источник происхождения неупорядоченных полимеров, наша модель развития предполагает формирование на первых порах дуплицированных структур (в простейшем случае — димеров), обладающих различной степенью симметрии.

Мы полагаем, что только линейные цепные полимеры, обладающие связностью основной цепи, могли эволюционировать и дать в дальнейшем каталитически активные и совершенные структуры. Наличие в них хиральности элементов, как мы видели (раздел 8.1.1.), способствует образованию спиральных структур, содержащих протяженные ССИВС. Разнообразие боковых цепей (полярных и неполярных), обладающих различной степенью связности, в сочетании со свойством связности

основной цепи могло способствовать появлению не только спиральных, но и развернутых фрагментов, а также определенной укладке этих фрагментов в третичную структуру. Цепь такого полимера обладает «молекулярной памятью» и при сохранении расположения боковых цепей потенциально может воссоздавать одну и ту же надмолекулярную структуру.

В структурах, сформированных неупорядоченными полимерами, могли возникать протяженные ССИВС, способные обеспечивать перенос зарядов. Существенно, чтобы в таких структурах в качестве вставочных элементов присутствовали и фосфатные группы, способные, по-видимому, активировать процесс переноса зарядов (см. раздел 10.3.4). При образовании дуплицированных структур случайно могли возникать такие, в которых ССИВС соединяли каталитические центры, с образованием петель обратной связи. Как мы видели, для рекуперации энергии нужны не только цепи обратной связи, но и использование обратного направления переноса зарядов, эффективность которого будет зависеть от степени приближения ЭДОКС к симметричной структуре.

10.5.3.3. ***Механизм развития ЭДОКС путем рекомбинации и отбора.*** Предложенный механизм предполагает, что в процессе развития ЭДОКС имеет место два типа изменений: в кинетической сфере, проявляющиеся как изменения каталитической активности и в конституционной сфере, связанные с перестройками, происходящими в их структуре.

Изменения в каталитической активности. Предположим, что мы имеем группу ЭДОКС, осуществляющих одну и ту же базисную реакцию и локализованных в пределах одного и того же ареала, т. е. образующих своеобразную популяцию. На начальном этапе они могли обладать какой-либо, достаточно низкой каталитической активностью (a_i) (схема 10.17):

$$\begin{array}{cccc} E_1/E_2 & E_3/E_4 & E_5/E_6 & E_7/E_8 \\ a_1 & a_2 & a_3 & a_4 \end{array} \qquad (10.19)$$

При определенных уловиях, например, в случае резкого изменения кинетической сферы ЭДОКС (температуры, pH, содержание ионов и субстратов) может иметь распад ЭДОКС на составляющие структуры и затем, формирование из них новых сочетаний (схема 10.18):

$$\begin{array}{cccc} E_1/E_3 & E_2/E_4 & E_5/E_7 & E_6/E_8 \\ a_1' & a_2' & a_3' & a_4' = 0 \end{array} \qquad (10.20)$$

При этом могло случиться, что сочетание E_6/E_8 оказалось неудачным и утратило каталитическую активность, а в остальных сочетаниях она стала такой: $a_1' > a_1$, $a_2' > a_2$, $a_3' > a_3$. Поскольку, согласно [188], гидролиз структур полипептидной природы может идти самопроизвольно, то каждое неэволюционное изменение ЭДОКС, т. е. не обладающее каталитической активностью, будет гидролизоваться до мономеров, а остальные продолжат свое существование и могут вступить в новый этап рекомбинации (схема 10.19):

$$\begin{array}{ccc} E_1/E_4 & E_2/E_7 & E_3/E_5 \\ a_1'' & a_2'' & a_3'' = 0 \end{array} \qquad (10.21)$$

В результате возникло новое сочетание с нулевой активностью (E_3/E_5), а активность новых сочетаний будет: $a_1'' > a_1' > a_1$ и $a_2'' > a_2' > a_3$. Для простоты мы

предполагаем, что каталитическая активность в удачных сочетаниях в результате рекомбинаций возрастает, хотя она, разумеется, может и снижаться. Однако, согласно основному закону химической эволюции (10.5.2.2.), максимальной вероятностью обладают цепи последовательных положительных изменений каталитической активности. Оно и понятно, ведь чем выше активность, тем выше стабильность ЭДОКС и продолжительность их существования. В результате большого числа рекомбинаций в системе будут оставаться ЭДОКС, обладающие максимальной каталитической активностью.

Изменения в структуре. Согласно модели катализа на основе ССИВС, ферменты должны обеспечивать рекуперацию энергии, выделившейся в процесса образования ФСК, путем формирования петли обратной связи из ССИВС; передача сигнала должна быть синхронизована со стадиями состояния субстрата, величина выходного сигнала должна быть оптимизирована. При этом дуплицированные структуры, содержащие ССИВС, должны обладать вращательной симметрией и поочередно работающими активными центрами. Эти особенности, по-видимому, будут формироваться в процессе рекомбинации и отбора дуплицированных структур по максимуму каталитической активности, Между активностью и симметрией структур имеется прямая связь: чем выше симметрия ЭДОКС, которые, как мы упоминали, первоначально могли обладать существенной асимметрией, тем выше каталитическая активность и частота колебаний, связанная с переключением направлений переноса заряда. Таким образом, в процессе отбора по максимуму активности степень симметрии ЭДОКС должна была автоматически возрастать.

Существенной особенностью структур, от которой также будет зависеть каталитическая активность, является, очевидно, формирование петель обратной связи, обеспечивающих синхронизованный со стадиями катализа процесс рекуперации энергии. По мере совершенствования каталитических механизмов степень синхронизации и, соответственно, к. п. д. рекуперации энергии будет возрастать (см. раздел 10.1.2). При этом, в процессе совершенствования механизмов могла происходить функциональная дифференциация элементов, входящих в ССИВС, появление и увеличение числа элементов задержки, инверсии сигналов т. д., т. е. формирование того канонического набора функциональных модулей, который существует в настоящее время (см. раздел 8.6.3).

10.5.3.4. ***Возникновение в ЭДОКС хиральности элементов.*** **Краткая характеристика проблемы.** Вопрос о причинах хиральности, т. е. факта существования в надмолекулярных структурах лишь одной из двух возможных стереоконфигураций биомолекул (например, L-аминокислот в белках или D-сахаров в полисахаридах и нуклеиновых кислотах), относится к числу нерешенных современной наукой [202–204]. Значение хиральности молекул для биоструктур сводят к таким факторам, как упрощение процессов молекулярного ухнавания, инструктирования информационных молекул, обеспечения однозначности химических реакций [202]. Благодаря хиральности создается большая прочность конструкции полимеров, например, образование α-спиралей и β-структур из полипептидов, а также возможность возникновения кооперативных эффектов.

Проблема происхождения хиральности имеет два аспекта: установление каузального, причинного фактора, приведшего к хиральности элементов структур, и выяснение причины предпочтения того или иного знака хиральности. Что касается первого

аспекта, то большая часть подходов, обобщенных в работах [202–204], сводится к следующим типам объяснений: гипотезы о космическом происхождении хиральности; воздействие гиротропических минералов одного знака; циркулярная поляризации солнечного света; нарушение четности в слабых взаимодействиях и ряд других. На второй вопрос обычно отвечают, что появление того или иного знака связано со случайной флуктуацией на одном из этапов предбиологической эволюции [203]. Существенно отметить, что большинство современных моделей происхождения хиральности исходят из предположения о внешнем источнике, определяющем появление мономеров одного знака и о предварительном накоплении элементов одного знака с последующим их использованием при синтезе полимеров. Эти подходы можно охарактеризовать как актуалистические, базирующиеся на тех же взглядах, которые наиболее приняты в сфере изучения проблем биогенеза.

Принципиальным отличием нашего подхода к этой проблеме, основном на естественно-историческом взгляде, является то, что *возникновение хиральности мы связываем не с внешними факторами, а, как было показано в разделе 5.2.4, с реализацией механизма переноса зарядов по ССИВС, т.е. имеет внутренние причины*. Рассмотрим подробнее с наших позиций оба аспекта происхождения хиральности.

Причины возникновения хиральности. Согласно нашей модели катализа на основе ССИВС, для работы димерных структур необходимы непрерывные ССИВС из HN–C=O-групп, которые возникают в α-спиралях и β-структурах белков. Образование таких непрерывных ССИВС возможно лишь при наличии единой стереоконфигурации исходных мономерных звеньев, что было показано экспериментально [205].

Кроме того, хиральность необходима для идентичной укладки субструктур с максимальной симметрией [206]. К этому можно добавить, что хиральность является условием работы боковых цепей аминокислот в качестве физических операторов в процессе воздания ими закодированной структуры белка [207]. Следовательно, использование ССИВС с участием различных групп для переноса зарядов должно было привести к отбору ЭДОКС, содержащих преимущественно хиральные элементы. Это обеспечивало большую эффективность переноса и рекуперации энергии в катализе, по сравнению со структурами, состоящими из рацемических полимеров. Последние формировали структуры с большим числом разрывов ССИВС.

Хиральность порождает хиральность. Более эффективные ЭДОКС из хиральных элементов могли осуществлять асимметрические базисные реакции, например, стереоспецифический синтез аминокислот. Накопление в среде мономеров одного типа создавало предпосылки их использования при синтезе линейных цепных полимеров из хиральных элементов. В свою очередь, этот фактор мог способствовать повышению активности ЭДОКС, формирующихся в симметрических реакциях, и т. д. Как видим, исходя из наших взглядов, процесс накопления хиральных элементов не требует вмешательства внешних сил и может происходить в результате рекомбинации и отбора активных дуплицированных структур по максимуму каталитической активности.

Происхождения знака хиральности. «Модель молекулярных войн». Попытки связать знак хиральности с моделью топологического кодирования цепных полимеров, в которой для α-спирали белка, закрученной вправо, в качестве физических операторов необходимы L-аминокислоты (см. разделы 8.4.2 и 8.4.5.), ни к чему определенному не привели. Дело в том, что в случае левозакрученной спирали

для этих целей, соответственно, предпочтительнее D-аминокислоты. Поэтому мы склоняемся к высказанной ранее мысли [3], что знак хиральности — дело случайного выбора и предложенная ранее модель «молекулярных войн» так и остается пока без изменений.

Как мы видели выше, абсолютная каталитическая активность ЭДОКС зависит от степени непрерывности ССИВС, определяющейся в значительной степени, для спиральных и листовых структур, степенью хиральности входящих в них элементов. Поскольку в пределах единого ареала, занимаемого популяцией ЭДОКС, могла иметь место их рекомбинация, то рано или поздно должны были отобраться структуры, имеющие 100 %-ю хиральность, причем одного знака. В нашем подходе нет каких-либо указаний на неравноправность того или иного знака хиральности.

Предположим, что мы имеем две популяции ЭДОКС, использующих один и тот же базисный процесс, однако под влиянием случайных флуктуаций, развившихся в структуры с разными знаками хиральности составляющих их элементов. До тех пор, пока существует изоляция этих ЭДОКС, их развитию в пределах избранного знака, ничто не препятствует. Допустим теперь, что между этими популяциями ЭДОКС под влиянием внешних факторов изоляция исчезла. В результате их перемешивания между ними будет иметь место рекомбинация. Поскольку субструктуры этих популяций имеют разный знак хиральности, то они будут несовместимы между собой в плане образования активных димеров. Поэтому результатом такой рекомбинации будет массовая гибель функционально неактивных димеров, состоящих из мономеров разного знака. Условно, как образное выражение, столкновения популяций ЭДОКС с разными знаками хиральности можно назвать «молекулярными войнами». При этом процесс гибели структур будет происходить до тех пор, пока не исчерпаются все ЭДОКС, которых было меньше. Таким образом, чем выше концентрация ЭДОКС в пределах занимаемого ареала, чем больше этот ареал, тем больше шансов, что при последующих контактах с чужеродными популяциями ЭДОКС другого знака хиральности, исходная популяция будет одерживать верх. Оставшиеся ЭДОКС увеличат свой ареал, и, меняя благодаря своему существованию состав среды, будут способствовать распространению ЭДОКС «победившего» знака хиральности. В результате «побед», одержанных наиболее многочисленной популяцией ЭДОКС над своими конкурентами в пределах всей планеты с течением времени мог утвердиться таким образом единый тип стерео конфигурации элементов, без которого невозможно было бы все последующее развитие надмолекулярных структур. При этом выбор знака хиральности в предковых ферментах, по-видимому, мог предопределить знак хиральности и в других типах структур, с ними взаимосвязанных, в частности, D-сахаров в нуклеиновых кислотах и L-фосфолипидов в нуклеопротеидах и мембранах [203].

10.5.3.5. ***Пределы совершенствования ЭДОКС.*** Согласно концепции эволюционного катализа [187, 188, 195], совершенствование структур ЭОКС ведет к достижению ими максимальной каталитической активности (I кинетический предел). То же можно представить и для ЭДОКС. Эволюционный рад ЭДОКС реализуется в результате изменений структуры, осуществляемых в результате процесса рекомбинации, и контролируется интенсивностью базисной реакции. Существенно отметить, однако, что в отличие от концепции саморазвития ЭОКС, рассматривающей их эволюцию как одиночных систем и не касающихся проблем их взаимодействие

между собой, в модели развития ЭДОКС этот процесс происходит как развитие популяции активных и постоянно рекомбинирующих между собой дуплицированных структур. Единым принципом, определяющим структурную организацию ЭДОКС на этом этапе, мог служить принцип континуальности (непрерывности) ССИВС при их построении, а принципом отбора — эффективность использования ССИВС в качестве каналов для переноса зарядов. Идеальными структурами, к которым могла идти эволюция ЭДОКС, могли быть такие, в которых полностью реализованы принципы нашей модели катализа на основе ССИВС.

Процесс накопления информации в ЭДОКС мог происходить в этом случае точно так же, как это требует концепция эволюционного катализа [195], т. е. путем отбора таких последовательностей в структуре надмолекулярных систем, которые приводили в результате самосборки к образованию функционально активных ЭДОКС. Наиболее существенное значение для их работы на этом этапе могли иметь группы, входящие в состав ССИВС петель обратной связи, а также группы области контакта субструктур, в которых локализованы входы и выходы ССИВС. В пределах популяции, имевшей сходную базисную реакцию, эти элементы в результате рекомбинации и отбора стабилизировались, и по мере достижения максимальной симметрии и наибольшей каталитической активности последующая рекомбинация уже не могла привести к повышению их каталитической активности. Наступал предел развития ЭДОКС. При достижении I кинетического предела, имеющего температурный характер, ЭДОКС приобретают максимально возможную для них каталитическую активность и предельное совершенство (симметрию) своей структурной и функциональной организации. Дальнейшие этапы эволюции ЭДОКС будут связаны с преодолением I-го и II-го кинетических пределов и состоят в формировании более сложных функций ЭДОКС, приближающих их к живым объектам. Это, в первую очередь, формирование ансамблей ферментов, сопровождающееся повышением ранга базисной реакции (с одной базисной реакцией оказываются связанными целые цепи промежуточных стадий) и умножение числа каталитических функций (полимеризация ансамблей с образованием мембранных структур в виде замкнутых пузырьков, отделяющих внутреннее пространство систем от внешней среды). Последний вариант является необходимой предпосылкой для накопления внутри таких систем запасных энергетических эквивалентов (типа полифосфатов), возникающих как один из продуктов базисной реакции. Это обеспечивало устойчивость таких систем при временном отсутствии субстратов, а также явилось предпосылкой еще одного этапа — накопления информации в виде полинулеотидфосфатов и последующего обмена ею между функциональными структурами. Этот беглый набросок дальнейшей эволюции ЭДОКС показывает, насколько естественно возникает путь появления простейших биосистем исходя из этой модели.

10.5.3.6. ***Популяционно-матричный механизм самовоспроизведения и развития ЭДОКС.*** Как мы видели выше, в процессе рекомбинации ЭДОКС могут возникать неактивные структуры, обреченные на гибель. Кроме того, активные ЭДОКС, под влиянием различных факторов также погибают, т. е. имеют конечную длительность жизни. Возникает поэтому следующие вопросы:

1. При каких условиях будут накапливаться упорядоченные структуры;

2. Почему, по мере гибели, не будет теряться информация, зафиксированная в виде удачных последовательностей звеньев в ЭДОКС.

Представим возможный механизм, обеспечивающий самовоспроизведение популяций ЭДОКС. Предположим, что создались условия, когда существует достаточное количество субстрата, дающего энергию для базисной реакции, и ЭДОКС эволюционировали путем рекомбинации и отбора, достигнув предельной в данных условиях каталитической активности и предельного совершенства своей структуры. Такие ЭДОКС будут также и максимально стабильными в данных условиях, что обеспечивалось максимальной эффективностью использования энергии базисной реакции для подержания их функциональной активности. Теперь допустим, что в эту популяцию попадают вновь синтезированные малоупорядоченные полимеры, которые формируют надмолекулярные структуры и вступают в рекомбинацию с более совершенными ЭДОКС. Те вновь синтезированные структуры, которые образуют комплексы с исходными субъединицами ЭДОКС с образованием каталитически активных дуплицированных структур, продолжат свое существование, а неактивные будут распадаться на субъединицы и подвергаться гидролизу до мономеров. Будет иметь место отбор на уровне популяции: достигшая определенного совершенства популяция ЭДОКС, включая в процесс рекомбинации мало упорядоченные структуры, обеспечит их быстрый отбор по степени соответствия уже сформировавшимся образцам. Иными словами, упорядоченность популяции ЭДОКС может действовать как активный фактор, способствующий пополнению популяции себе подобными структурами, т. е. самовоспроизведению популяции. Можно сказать, что сама популяция в этом случае является той упорядочивающей матрицей, на основе которой может происходить ее же самовоспроизведение. Поэтому такой механизм самовоспроизведения структур мы назвали популяционно-матричным.

Интересно сопоставить предложенный выше механизм с механизмом самоорганизации на основе гиперцикла М. Эйгена [191]. Для последнего механизма требуется появление инструктирующих матриц, нуклеиновых кислот, содержащих закодированную информацию о белках, необходим механизм декодирования и синтеза ДНК-полимеразы, масса других вспомогательных механизмов, которые могли бы обеспечить функционирование гиперцикла, например, источники нуклеотидов и т. д. По сути, для осуществления автономного гиперцикла необходима целостная клетка. Наш механизм существенно отличается также и от представлений о неорганических и органических матрицах, которые могли бы служить основой для формирования упорядоченных структур [208, 209]. В популяционно-матричном механизме естественной матрицей для отбора служит субъединица ЭДОКС, достигшая определенной степени развития. В ней содержится закрепленная в первичной структуре звеньев информация, обеспечивающая после ее самоорганизации наиболее эффективный катализ. Однако сам механизм воспроизведения может реализоваться только на уровне популяции, поскольку одна субъединица, естественно, ничего не решает. Таким образом, механизм рекомбинации активных дуплицированных структур, содержащих в своей основе ССИВС, используемые как каналы переноса зарядов, и отбора этих структур по максимуму каталитической активности приводит к принципиально новой, популяционно-матричной модели развития и самовоспроизведения ЭДОКС, прототипа будущих ферментов. Эта модель для своей реализации не требует ничего, кроме исходных неупорядоченных полимеров и задания определенной базисной реакции. Некоторые возможные эксперименты по моделированию отдельных аспектов этой модели были предложены ранее [3, 201].

Мы полагаем, что и последующие, более сложные этапы предбиологической эволюции осуществлялись на основе описанного механизма, который целиком был унаследован биосистемами. Тем самым, мы приходим к выводу о том, что основные механизмы эволюции живых систем — рекомбинации и отбора по максимуму функциональной активности — были заложены в самом начале биогенеза, на уровне эволюции простейших надмолекулярных структур. Они были предопределены принципом континуальности ССИВС при построении этих структур и использованием ССИВС в качестве каналов для переноса зарядов.

10.6. Модель катализа на основе ССИВС и ее значение для разработки проблем бионической наноэлектроники, биокатализа и биогенеза

Подведем некоторые итоги. В настоящей главе была поставлена задача построить модель работы простейшего молекулярного процессора, способного осуществлять ряд развернутых во времени операций молекулярного химического преобразования одной молекулы в другую. Ближайшими биологическими устройствами такого рода оказались олигомерные ферменты. Нами была разработана модель работы олигомерных ферментов, использующих ССИВС как основу для их построения и как каналы для переноса зарядов.

Для реализации этой модели оказалось необходимым:

— создать петлю обратной связи, идущую от субстрата и обратно к субстрату для целей рекуперации энергии, выделющейся в ходе образования фермент-субстратного комплекса;

— обеспечить синхронизацию переноса зарядов по ССИВС со стадиями превращения субстрата путем регуляции длины ССИВС и введения в их состав элементов задержки и инверсии сигнала;

— регулировать процесс катализа путем введения в состав ССИВС групп, не претерпевающих в процессе катализа (аллостерических регуляторов);

— использовать обратное направление переноса зарядов по ССИВС путем построения катализатора из отдельных субъединиц, число которых, как правило, должно быть четным;

— учитывать возможность перестройки ССИВС в процессе катализа, что обеспечивает пространственно-временную развертку отдельных этапов преобразования субстрата в продукт.

Руководствуясь изложенными выше общими принципами, в сочетании с другими походами, можно проводить конкретную разработку молекулярных процессоров, осуществляющих химические преобразования молекул. В этом состоит основное значение этой модели для бионической наноэлектроники.

Анализ существующей литературы показал, что отдельные аспекты этой модели так или иначе рассматривались и другими авторами. Однако наиболее полное и целостное их отражение представлено только в нашей модели. На основе модели были рассмотрены структуры ряда конкретных ферментов (алкогольдегидрогеназы, АТФ-азы). Показано, что многие элементы этой модели реально в них обнаруживаются, что указывает на перспективность ее использования при изучении механизмов биокатализа.

Разработанная модель явилась отправной точкой для анализа литературы по «флип-флоп» механизму катализа олигомерными ферментами и позволила сформулировать идею об универсальности этого механизма.

Модель катализа была использована для анализа проблем происхождения олигомерных ферментов и биогенеза. С учетом концепции эволюционного катализа, разработанной А. П. Руденко, была предложена популяционно-матричная модель происхождения и развития олигомерных ферментов. В рамках этой модели элементарной единицей в предбиологической эволюции считается популяция активных дуплицированных структур, а основным механизмом их развития — процесс их рекомбинации и отбора по максимуму функциональной активности. Предполагается, что этот механизм, являющийся основным в эволюции живых систем, был заложен в самом начале биогенеза, на уровне эволюции простейших надмолекулярных структур. Его появление было предопределено принципом континуальности ССИВС при построении этих структур и использованием ССИВС в качестве каналов для переноса зарядов.

Литература к главе 10

1. *Карасев В.А.*, *Стефанов В.Е.* «Реакционная способность половины от числа активных центров» как проявление симметрии переноса энергии в олигомерных ферментах // Мол. биол. 1986. Т. 20. С. 712–719.
2. *Карасев В.А.*, *Стефанов В.Е.* «Флип-флоп»-механизм в ферментативном катализе: гипотеза универсальности // Успехи соврем. биол. 1989. Т. 108. С. 235–249.
3. *Карасев В.А.*, *Стефанов В.Е.*, *Курганов Б.И.* Надмолекулярные биоструктуры: организация, функционирование, происхождение // В кн.: Итоги науки и техники. Сер. Биол. химия. Т. 31. — М.: ВИНИТИ, 1989. — 199 с.
4. *Кобозев Н.И.* О механизме катализа. III. О валентной и энергетической форме гетерогенного и ферментного катализа // Журн. физ. Химии. 1960. Т. 34. С. 1443–1459.
5. *Волькенштейн М.В.*, *Голованов Н.Б.*, *Соболев В.М.* Молекулярные орбитали в энзимологии. — М.: Наука, 1982. — 239 с.
6. *Fischer E.* Einfluss der Configuration auf die Wirkung der Enzyme // Ber. dt. Che. Ges. 1894. B. 27. S. 2985–2993.
7. *Haldane J.B.S.* Enzymes. — Longmans, Green and Co., 1930. — 180 p.
8. *Pauling L.* Molecular architecture and biological reactions // Chem. Engng. News. 1946. V. 27. P. 1375–1377.
9. *Eyring H.*, *Lumry R.*, *Spikes J.D.* Kinetic and thermodynamic aspects of enzyme-catalyzed reactions // In: The mechanism of enzyme action. — Baltimore: J. Hopkins Press, 1954. P. 123–140.
10. *Lamry R.* Some aspects of thermodynamics and mechanism of enzyme catalysis // In: The enzymes. 2-nd ed. — N.Y.: Acad. Press. 1959. V. 1. P. 157–231.
11. *Косовер Е.М.* Молекулярная биохимия. — М.: Мир, 1964. — 336 с.
12. *Koshland D.E. Jr.* Application of a theory of enzyme specificity to protein synthesis // Proc. Natl., Acad. Sci. USA. 1958. V. 44. P. 98–104.
13. *Koshland D.E. Jr.* The active site and enzyme action // Adv. Enzymol. 1960. V. 22. P. 45–97.
14. *Волькенштейн М.В.* Электронно-конформационные взаимодействияы в биологических системах // Изв. Акад. Наук СССР. Сер. биол. 1971. № 6. С. 805–818.
15. *Volkenstein M.V.* Simple physical presentation on enzymatic catalysis // J. Theor. Biol. 1981. V. 89. P. 45–51.
16. *Волькенштейн М.В.*, *Догонадзе Р.Р.*, *Мадумаров А.К. и др.* К теории ферментативного катализа // Мол. биол. 1972. Т. 6. С. 431–439.
17. *Блюменфельд Л.А.* Проблемы биологической физики. — М.: Наука, 1977. — 336 с.
18. *Blumenfeld L.A.* The physical aspects of enzyme functioning // J. Theor. Biol. 1976. V. 58. P. 269–284.
19. *Krishtalik L.J.* Catalytic acceleration of reactions by enzymes. Effect of screening of polar medium by a protein globule // J. Theor. Biol. 1980. V. 86. P. 757–771.
20. *Volkenstein M.V.* The Conformon // J. Theor. Biol. 1972. V. 34. P. 193–195.
21. *Ji S.* Free energy and information contents of conformons in proteins and DNA // . Biosystems. 2000. V. 54. P. 107–130.
22. *Бауэр Э.С.* Теоретическая биология. Перепеч. изд. 1935. — Будапешт: Акад. наук Венгрии, 1982. — 295 с.

23. *Jencks W.P.* Binding energy? Specificity and enzymic catalysis. The circle effect // Adv. Enzymol. 1975. V. 43. P. 219–410.
24. *Хургин Ю.И.*, *Чернавский Д.С.*, *Шноль С.Э.* Об упругих деформациях белка-фермента // Мол. биол. 1967. Т. 1. С. 419–424.
25. *Чернавский Д.С.*, *Хургин Ю.И.*, *Шноль С.Э.* Концепция «белок-машина» и ее следствия // Биофизика. 1987. Т. 32. С. 775–781.
26. *Чернавский Д.С.* Принципы биологического катализа // В кн. Итоги науки и техники. Сер. Математическая биология и медицина. Т. 1. — М.: ВИНИТИ. 1978. С. 9–57.
27. *Болдырев А.А.*, *Швец В.И.* Значение олигомерной организации для функционирования транспортных аденозинтрифосфатаз // Науч. докл. высш. шк. Сер. Биол. науки. 1981. № 2. С. 21–31.
28. *Dogonadse R.R.*, *Kuznetsov A.M.*, *Ulstrup J.* Conformational dynamics in biological electron and atom transfer reactions // J. Theor. Biol. 1977. V. 69. P. 239–263.
29. *Blow D.M.*, *Birktoft J.J.*, *Hartley B.S.* Role of a buried acid group in the mechanism of action of chimotrypsin // Nature. 1969. V. 221. P. 337–340.
30. *Полторак О.М.* Элементарные акты гетеролитических реакций органической химии и ферментативного катализа и теория цепей перераспределения связей // Вест. Моск. ун-та. 1974. Т. 15. С. 3–29.
31. *Metzler D.E.* Tautomerism in pyridoxal phosphate and in enzymatic catalysis // Adv. Enzymol. 1979. V. 50. P. 1–40.
32. *Ressler N.* Electronics aspects of enxyme catalysis: proton-electron density displacements // J. Theor. Biol. 1982. V. 97. P. 195–225.
33. *Koshland D.E. Jr.* Nemethy G., Filmer G. Comparison of experimental binding data and theoretical models in protein containing subunits // Biochemistry. 1966. V. 5. P. 365–385.
34. *Monod J.*, *Wyman J.*, *Changeux J.-P.* On the nature of allosteric transitions: A plausible model // J. Mol. Biol. 1965. V. 12. P. 88–118.
35. *Фридрих П.* Ферменты: четвертичная структура и надмолекулярные комплексы / Пер. с англ. — М.: Мир, 1986. — 374 с.
36. *Viratelle O.M.*, *Seidoux F.J.* Pseudoconservative transition: a two-state model for cooperative behavior of oligomeric protein // J. Mol. Biol. 1975. V. 92. P. 193–205.
37. *Olavarria J.M.* Does the coupling between conformational fluctuation and enzyme catalysis involve a true phase transfer catalysis? // J. Theor. Biol. 1982. V. 99. P. 21–30.
38. *Harada K.*, *Wolfe R.* Malic dehydrogenase. VII. The catalytic mechanism and possible role of identical subunits // J. Biol. Chem. 1968. V. 243. P. 4131–4137.
39. *Lazdunski M.*, *Petitclerc C.*, *Chappelet D.*, *Lazdunski C.* Flip-flop mechanism in enzymology. A model: the alkaline phosphatase of Escherichia coli // Europ. J. Biochem. 1971. V. 20. P. 124–139.
40. *Seydoux F.*, *Malhotra O.P.*, *Bernhard S.A.* Half-site reactivity // CRC Crit. Rev. Biochem. 1974. V. 2. P. 227–257.
41. *Levitzki A.*, *Koshland D.E. Jr.* The role of negative cooperativity and half-of-the-sites reactivity in enzyme regulation // Curr. Top. Cell Regul. 1976. V. 10. P. 1–40.
42. Huang CY, Rhee SG, Chock PB. Subunit cooperation and enzymatic catalysis // Annu. Rev. Biochem. 1982. V. 51. P. 935–971.
43. *Lazdunski M.* «Half-of-the-sites» reactivity and the role of subunit interactions in enzyme catalysis // Progr. Bioorg. Chem. 1974. V. 3. P. 81–140.
44. Walsh CT. Suicide substrates, mechanism-based enzyme inactivators: recent developments // Annu. Rev. Biochem. 1984. V. 53. P. 493–535.
45. *Luisi P.L.*, *Zandomeneghi M.* A mechanical model for the half-of-the-sites reactivity of oligomeric enzymes // Biopys. Chem. 1974. V. 1. P. 358–366.

46. *Bugrii G.V.*, *Kukhtin V.V.* The effect of electron transport on the kinetics of the manganese-containing superoxide dismutase from Bacillus staerothermophilus // J. Theor. Biol. 1981. V. 90. P. 161–167.
47. *Degani C.*, *Degani Y.* Further evidence for nonsymmetric subunit association and intersubunit cooperativity in creatine kinase. Subunit-selective modifications by 2,4-dinitrophenylthiocyanate // J. Biol. Chem. 1980. V. 255. P. 8221–8228.
48. *Jencks W.P.* A primer for the Bema Hapothle–an empirical-approach to the characterization of changing transition-state structures // Chem. Rev. 1985. V. 85. P. 511–527.
49. *Schowen K.B.*, *Limbach H.-H.*, *Denisov G.S.*, *Schowen R.L.* Hydrogen bonds and proton transfer in general-catalytic transition-state stabilization in enzyme catalysis // Biochim. Biophys. Acta. 2000. V. 1458. P. 43–62.
50. *Doll K.M.*, *Finke R.G.* A compelling experimental test of the hypothesis that enzymes have evolved to enhance quantum mechanical tunneling in hydrogen transfer reactions: the beta-neopentylcobalamin system combined with prior adocobalamin data // Inorg. Chem. 2003. V. 42. P. 4849–4856.
51. *Basran J.*, *Harris R.J.*, *Sutcliffe M.J.*, *Scrutton N.S.* H-tunneling in the multiple H-transfers of the catalytic cycle of morphinone reductase and in the reductive half-reaction of the homologous pentaerythritol tetranitrate reductase // J. Biol. Chem. 2003. V. 278. P. 43973–43982.
52. *Davidson V.L.* Electron transfer in quinoproteins // Arch. Biochem. Biophys. 2004. V. 428. P. 32–40.
53. Liang Zh.X. Klinman J. P. Structural bases of hydrogen tunneling in enzymes: progress and puzzles // Curr. Opin. Struct. Biol. 2004. V. 14. P. 648–655.
54. *Bahnson B.J.*, *Colby T.D.*, *Chin J.K.*, *Goldstein B.M.*, *Klinman J.P.* A link between protein structure and enzyme catalyzed hydrogen tunneling // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1997. V. 94. P. 12797–12802.
55. *Dunn C.R.*, *Wilks H.M.*, *Halsall D.J.*, *Atkinson T.*, *Clarke A.R.*, *Muirhead H.*, *Holbrook J.J.* Design and synthesis of new enzymes based on the lactate dehydrogenase framework // Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. 1991. V. 332. P. 177–184.
56. *Kelly C.A.*, *Nishiyama M.* Ohnishi, Beppu T., Birktoft J. J. Determinants of protein thermostability observed in the 1.9 Å crystal structure of malate dehydrogenase from the thermophilic bacterium Thermus flavus // Biochemistry. 1993. V. 32. P. 3913–3922.
57. *Shen Y.Q.*, *Song S.Y.*, *Lin Z.J.* Structures of D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase complexed with coenzyme analogues // Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr. 2002. V. 58. P. 1287–1297.
58. *Fita I.*, *Rossmann M.G.* The NADPH binding site on beef liver catalase // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1985. V. 82. P. 1604–1608.
59. 59.*McFarland J.T., Bernhard S.A.* Catalytic steps during the single-turnover reduction of aldehydes by alcohol dehydrogenase // Biochemistry. 1972. V. 11. P. 1486–1193.
60. *Bernhard S.A.*, *Dunn M.F.*, *Luisi P.L.*, *Schack P.* Mechanistic studies on equine liver alcohol dehydrogenase. I. The stoichiometry relationship of the coenzyme binding sites to the catalytic sites active in the reduction of aromatic aldehydes in the transient state // Biochemistry. 1970. V. 9. P. 185–192.
61. *Dunn M.F.*, *Bernhard S.A.* Rapid kinetic evidence for adduct formation between the substrate analog p-nitroso-N,N-dimethylaniline and reduced nicotinamide-adenine dinucleotide during enzymic reduction // Biochemistry. 1971. V. 10. P. 4569–4575.
62. *Anderson D.C.*, *Dahlquist F.W.* Determination of the equilibrium distibution between alcohol and aldehyde substrates when bound to horse liver alcohol dehydrogenase using magnetic resonance // Biochemistry. 1980. V. 19. P. 5486–5493.

63. *Harada K.*, *Wolfe R.G.* Malic dehydrogenase. VI. A kinetic study of hydroxymalonate inhibition // J. Biol. Chem. 1968. V. 243. P. 4123–4130.
64. *Tsernoglou D.*, *Hill E.*, *Banaszak L.J.* Structural studies on heart muscle malate dehydrogenases // Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 1972. V. 36. P. 171–178.
65. *Pry T.A.*, *Hsu R.Y.* Equilibrium substrate binding studies of the malic enzyme of pigeon liver. Equivalence of nucleotide sites and anticooperativity associated with the binding of L-malate to the enzyme-manganese(II)-reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate ternary complex // Biochemistry. 1980. V. 19. P. 951–962.
66. *Aulabaugh A.*, *Kapoor B.*, *Huang X.*, *Dollings P.* Hum WT, Banker A, Wood A, Ellestad G. Biochemical and biophysical characterization of inhibitor binding to caspase-3 reveals induced asymmetry // Biochemistry. 2007. V. 46. P. 9462–9471.
67. *Golovina T.O.*, *Muronetz V.I.*, *Nagradova N.K.* Half-of-the-sites reactivity of rat skeletal muscle D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase // Biochim. Biophys. Acta. 1978. V. 524. P. 15–25.
68. *MacQuarrie R.A.*, *Bernhard S.A.* Subunit conformation and catalytic function in rabbit-muscle glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase // J. Mol. Biol. 1971. V. 55. P. 181–192.
69. *Henis Y.I.*, *Levitzki A.* The sequential nature of the negative cooperativity in rabbit muscle glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase // Eur. J. Biochem. 1980. V. 112. P. 59–73.
70. *Stallcup W.B.*, *Koshland D.E. Jr.* Half-of-the sites reactivity and negative co-operativity: the case of yeast glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase // J. Mol. Biol. 1973. V. 80. P. 41–62.
71. *Ramaswamy S.*, *Eklund H.*, *Plapp B.V.* Structures of horse liver alcohol dehydrogenase complexed with NAD+ and substituted benzyl alcohols // Biochemistry. 1994. V. 33. P. 5230–5237.
72. *Cho H.*, *Ramaswamy S.*, *Plapp B.V.* Flexibility of liver alcohol dehydrogenase in stereoselective binding of 3-butylthiolane 1-oxides // Biochemistry. 1997. V. 36. P. 382–389.
73. *Rubach J.K.*, *Ramaswamy S.*, *Plapp B.V.* Contributions of valine-292 in the nicotinamide binding site of liver alcohol dehydrogenase and dynamics to catalysis // Biochemistry. 2001. V. 40. P. 12686–12694.
74. *Rubach J.K.*, *Plapp B.V.* Mobility of fluorobenzyl alcohols bound to liver alcohol dehydrogenases as determined by NMR and X-ray crystallographic studies // Biochemistry. 2002. V. 41. P. 15770–15779.
75. *Venkataramaiah T.H.*, *Plapp B.V.* Formamides mimic aldehydes and inhibit liver alcohol dehydrogenases and ethanol metabolism // J. Biol. Chem. 2003. V. 278. P. 36699–36706.
76. *Rubach J.K.*, *Plapp B.V.* Amino acid residues in the nicotinamide binding site contribute to catalysis by horse liver alcohol dehydrogenase // Biochemistry. 2003. V. 42. P. 2907–2915.
77. *LeBrun L.A.*, *Park D.H.*, *Ramaswamy S.*, *Plapp B.V.* Participation of histidine-51 in catalysis by horse liver alcohol dehydrogenase // Biochemistry. 2004. V. 43. P. 3014–3026.
78. *Al-Karadaghi S.*, *Cedergren-Zeppezauer E.S.*, *Hovmoller S.* Refined crystal structure of liver alcohol dehydrogenase-NADH complex at 1.8 Å resolution // Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr. 1994. V. 50. P. 793–807.
79. *Al-Karadaghi S.*, *Cedergren-Zeppezauer E.S.*, *Dauter Z.*, *Wilson K.S.* Refined structure of Cu-substituted alcohol dehydrogenase at 2.1 Å resolution // Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr. 1995. V. 51. P. 805–813.
80. *Meijers R.*, *Morris R.J.*, *Adolph H.W.*, *Merli A.*, *Lamzin V.S.*, *Cedergren-Zeppezauer E.S.* On the enzymatic activation of NADH // J. Biol. Chem. 2001. V. 276. P. 9316–9321.

81. *Colby T.D.*, *Bahnson B.J.*, *Chin J.K.*, *Klinman J.P.*, *Goldstein B.M.* Active site modifications in a double mutant of liver alcohol dehydrogenase: structural studies of two enzyme-ligand complexes // Biochemistry. 1998. V. 37. P. 9295–9304.
82. *Bahnson B.J.*, *Colby T.D.*, *Chin J.K.*, *Goldstein B.M.*, *Klinman J.P.* A link between protein structure and enzyme catalyzed hydrogen tunneling // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1997. V. 94. P. 12797–12802.
83. *Eklund H.* Samama J-P, Jones T A. Crystallographic investigations of nicotinamide adenine dinucleotide binding to horse liver alcohol dehydrogenase // Biochemistry. 1984. V. 23. P. 5982–5996.
84. *Ramaswamy S.*, *Eklund H.* Plapp B V. Structures of horse liver alcohol dehydrogenase complexed with NAD+ and substituted benzyl alcohols // Biochemistry. 1994. V. 33. P. 5230–5237.
85. *Braig K.*, *Menz R.I.*, *Montgomery M.G.*, *Leslie A.G.W.*, *Walker J.E.* Structure of bovine mitochondrial F1-ATPase inhibited by Mg^{2+}ADP and aluminium fluoride // Structure (London). 2000. V. 8. P. 567–573.
86. *Menz R.I.*, *Walker J.E.*, *Leslie A.G.* Structure of bovine mitochondrial F(1)-ATPase with nucleotide bound to all three catalytic sites: implications for the mechanism of rotary catalysis // Cell. 2001. V. 106. P. 331–341.
87. Номенклатура ферментов. Рекомендации Международного биохимического союза по номенклатуре и классификации ферментов, а также по единицам ферментов исимволам кинетики ферментов. — М., 1979. — 321 с.
88. *Franzen J.S.*, *Ishman R.*, *Feingold D.S.* Half-of-the-sites reactivity of bovine liver uridine diphosphoglucose dehydrogenase toward iodoacetate and iodoacetamide // Biochemistry. 1976. V. 15. P. 5665–5671.
89. *Franzen J.S.*, *Marchetti P.*, *Ishman R.*, *Ashcom J.* Half-sites oxidation of bovine liver uridine diphosphate glucose dehydrogenase // Biochem. J. 1978. V. 173. P. 701–704.
90. *Dallocchio F.*, *Matteuzzi M.*, *Bellini T.* Effect of the substrate on the binding of coenzyme and coenzyme analogues to 6-phosphogluconate dehydrogenase from Candida utilis // J. Biol. Chem. 1981. V. 256. P. 10778–10780.
91. *Yoshimura T.*, *Matsushima A.*, *Aki K.*, *Kakiuchi K.* Formation of a complex between yeast L-lactate dehydrogenase (cytochrome b2) and cytochrome c. Ultracentrifugal and gel chromatographic analyses // Biochim. Biophys. Acta. 1977. V. 492. P. 331–339.
92. *Cromartie T.H.* Irreversible inactivation of the flavoenzyme alcohol oxidase by cyclopropanone // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1982. V. 105. P. 785–790.
93. *Hurley T.D.*, *Perez-Miller S.*, *Breen H.* Order and disorder in mitochondrial aldehyde dehydrogenase // Chem. Biol. Interact. 2001. V. 130–132. P. 3–14.
94. *Biellmann J.F.*, *Eid P.*, *Hirth C.*, *Jornvall H.* Aspartate-beta-semialdehyde dehydrogenase from Escherichia coli. Affinity labeling with the substrate analogue L-2-amino-4-oxo-5-chloropentanoic acid: an example of half-site reactivity // Eur. J. Biochem. 1980. V. 104. P. 59–64.
95. *Ehrenfeld M.*, *Jeck R.*, *Klatte W.*, *Kuhn N.*, *Woenckhaus C.* Half-of-the-sites reactivity of glyceraldehyde-3 phosphate dehydrogenase from rabbit muscle with structural analogs of NAD // Z. Naturforsch. C. 1981. V. 36. P. 545–551.
96. *Kelemen N.*, *Kellershohn N.*, *Seydoux F.* Sturgeon glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase // Eur. J. Biochem. 1975. V. 57. P. 69–78.
97. *Seydoux F.*, *Bernhard S.*, *Pfenninger O.*, *Payne M.*, *Malhotra O.P.* Preparation and active-site specific properties of sturgeon muscle glyceraldehyde-3-phoshate dehydrogenase // Biochemistry. 1973. V. 12. P. 4290–4300.

98. *Yeaman S.J.*, *Hutcheson E.T.*, *Roche T.E.*, *Pettit F.H.*, *Brown J.R.*, *Reed L.J.*, *Watson D.C.*, *Dixon G.H.* Sites of phosphorylation on pyruvate dehydrogenase from bovine kidney and heart // Biochemistry. 1978. V. 17. P. 2364–2370.
99. *Khailova L.S.*, *Korochkina L.G.* Half-of-the-site reactivity of the decarboxylating component of the pyruvate dehydrogenase complex from pigeon breast muscle with respect to 2-hydroxyethyl thiamine pyrophosphate // Biochem. Int. 1985. V. 11. P. 509–516.
100. *Буник В.И.*, *Гомазкова В.С.* Неэквивалентность активных центров альфа-кетоглютаратдегидрогеназы определенной путем модификации остатков гистидина // Биохимия. 1985. Т. 50. С. 1668–1675.
101. *Rasool C.G.*, *Nicolaidis S.*, *Akhtar M.* The asymmetric distribution of enzymic activity between the six subunits of bovine liver glutamate dehydrogenase. Use of D- and L-glutamyl alpha-chloromethyl ketones (4-amino-6-chloro-5-oxohexanoic acid // Biochem. J. 1976. V. 157. P. 675–686.
102. *Alex S.*, *Bell J.E.* Dual nucleotide specificity of bovine glutamate dehydrogenase. The role of negative co-operativity // Biochem. J. 1980. V. 191. P. 299–304.
103. *Paech C.*, *Salach J.I.*, *Singer T.P.* Suicide inactivation of monoamine oxidase by trans-phenylcyclopropylamine // J. Biol. Chem. 1980. V. 255. P. 2700–2704.
104. *Chuang H.Y.*, *Patek D.R.*, *Hellerman L.* Mitochondrial monoamine oxidase. Inactivation by pargyline. Adduct formation // J. Biol. Chem. 1974. V. 249. P. 2381–2384.
105. *Phelps D.C.*, *Hatefi Y.* Mitochondrial nicotinamide nucleotide transhydrogenase: active site modification by 5'-[p-(fluorosulfonyl)benzoyl] adenosine // Biochemistry. 1985. V. 24. P. 3503–3507.
106. *Prasad G.S.*, *Wahlberg M.*, *Sridhar V.*, *Sundaresan V.*, *Yamaguchi M.*, *Hatefi Y.*, *Stout C.D.* Crystal structures of transhydrogenase domain I with and without bound NADH // Biochemistry. 2002. V. 41. P. 12745–12754.
107. *Goenrich M.*, *Duin E.C.*, *Mahlert F.*, *Thauer R.K.* Temperature dependence of methyl-coenzyme M reductase activity and of the formation of the methyl-coenzyme M reductase red2 state induced by coenzyme B // J. Biol. Inorg. Chem. 2005. V. 10. P. 333–342.
108. *Bisson R.*, *Jacobs B.*, *Capaldi R.A.* Binding of arylazidocytochrome c derivatives to beef heart cytochrome c oxidase: cross-linking in the high- and low-affinity binding sites // Biochemistry. 1980. V. 19. P. 4173–4178.
109. *Nalecz K.A.*, *Bolli R.*, *Azzi A.* Preparation of monomeric cytochrome C oxidase: its kinetics differ from those of the dimeric enzyme // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1983. V. 114. P. 822–828.
110. *Schmitt M.E.*, *Trumpower B.L.* Subunit 6 regulates half-of-the-sites reactivity of the dimeric cytochrome bc1 complex in Saccharomyces cerevisiae // J. Biol. Chem. 1990. V. 265. P. 17005–17011.
111. *Epp O.*, *Ladenstein R.*, *Wendel A.* The refined structure of the selenoenzyme glutathione peroxidase at 0.2-nm resolution // Eur. J. Biochem. 1983. V. 133. P. 51–69.
112. *Sjoberg B.M.*, *Karlsson M.*, *Jornvall H.* Half-site reactivity of the tyrosyl radical of ribonucleotide reductase from Escherichia coli // J. Biol. Chem. 1987. V. 262. P. 9736–9743.
113. *Suter P.*, *Rosenbusch J.P.* Determination of ligand binding: partial and full saturation of aspartate transcarbamylase. Applicability of a filter assay to weakly binding ligands // J. Biol. Chem. 1976. V. 251. P. 5986–5991.
114. *Belfort M.*, *Maley G.F.*, *Maley F.* A single functional arginyl residue involved in the catalysis promoted by Lactobacillus casei thymidylate synthetase // Arch. Biochem. Biophys. 1980. V. 204. P. 340–349.
115. *Kovina M.V.*, *Kochetov G.A.* Cooperativity and flexibility of active sites in homodimeric transketolase // FEBS Lett. 1998. V. 440. P. 81–84.

116. *Tsolas O.*, *Horecker B.L.* Half-of-the-sites activity of transaldolase: titration of the active site and characteristics of the slow reaction catalyzed by the second subunit // Arch. Biochem. Biophys. 1976. V. 173. P. 577–585.
117. *Brand K.*, *Tsolas O.*, *Horecker B.L.* Evidence for a specific function for histidine residues in transaldolase // Arch. Biochem. Biophys. 1969. V. 130. P. 521–529.
118. *Lien S.*, *Gustafsson A.*, *Andersson A.K.*, *Mannervik B.* Human glutathione transferase A1-1 demonstrates both half-of-the-sites and all-of-the-sites reactivity // J. Biol. Chem. 2001. V. 276. P. 35599–35605.
119. *Kirsten H.*, *Gehring H.*, *Christen P.* Crystalline aspartate aminotransferase: lattice-induced functional asymmetry of the two subunits // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1983. V. 80. P. 1807–1810.
120. *Кочкина В.М.*, *Кузнецов Д.А.* Каталитические свойства аспартатамино-трансферазы // Биохимия. 1986. Т. 51. С. 921–925.
121. *Burnett G.*, *Marcotte P.*, *Walsh C.* Mechanism-based inactivation of pig heart L-alanine transaminase by L-propargylglycine. Half-site reactivity // J. Biol. Chem. 1980. V. 255, № 8. P. 3487–3491.
122. *Badet B.*, *Vermoote P.*, *Haumont P.Y.*, *Lederer F.*, *LeGoffic F.* Glucosamine synthetase from Escherichia coli: purification, properties, and glutamine-utilizing site location // Biochemistry. 1987. V. 26. P. 1940–1948.
123. *Churchich J.E.*, *Moses U.* 4-Aminobutyrate aminotransferase. The presence of nonequivalent binding sites // J. Biol. Chem. 1981. V. 256. P. 1101–1104.
124. *Bower S.*, *Zalkin H.* Chemical modification and ligand binding studies with Escherichia coli glutamate synthase // Biochemistry. 1983. V. 22. P. 1613–1620.
125. *Bystrom C.E.*, *Pettigrew D.W.*, *Branchaud B.P.*, *O'Brien P.*, *Remington S.J.* Crystal structures of Escherichia coli glycerol kinase variant S. 58–>W in complex with nonhydrolyzable ATP analogues reveal a putative active conformation of the enzyme as a result of domain motion // Biochemistry. 1999. V. 38. P. 3508–3518.
126. *Degani Y.*, *Degani C.* Subunit-selective chemical modifications of creatine kinase. Evidence for asymmetrical association of the subunits // Biochemistry. 1979. V. 18. P. 5917–5923.
127. *Severin S.E.*, *Belousova L.V.*, *Moskvitina E.L.* Essential arginine residues of creatine kinase from beef heart mitochondria // Biochem. Int. 1983. V. 6. P. 149–156.
128. *Spassky A.*, *Busby S.J.*, *Danchin A.*, *Buc H.* On the binding of tRNA to Escherichia coli RNA polymerase // Eur. J. Biochem. 1979. V. 99. P. 187–201.
129. *Levit M.*, *Liu Y.*, *Surette M.*, *Stock J.* Active site interference and asymmetric activation in the chemotaxis protein histidine kinase CheA // J. Biol. Chem. 1996. V. 271. P. 32057–32063.
130. *Roberts M.F.*, *Deems R.A.*, *Mincey T.C.*, *Dennis E.A.* Chemical modification of the histidine residue in phospholipase A2 (Naja naja naja). A case of half-site reactivity // J. Biol. Chem. 1977. V. 252. P. 2405–2411.
131. *Hendrickson H.S.*, *Dennis E.A.* Kinetic analysis of the dual phospholipid model for phospholipase A2 action // J. Biol. Chem. 1984. V. 259. P. 5734–5739.
132. *Ubarretxena-Belandia I.*, *Cox R.C.*, *Dijkman R.*, *Egmond M.R.*, *Verheij H.M.*, *Dekker N.* Half-of-the-sites reactivity of outer-membrane phospholipase A against an active-site-directed inhibitor // Eur. J. Biochem. 1999. V. 260. P. 794–800.
133. *Kunishima N.*, *Asada Y.*, *Sugahara M.*, *Ishijima J.*, *Nodake Y.*, *Sugahara M.*, *Miyano M.*, *Kuramitsu S.*, *Yokoyama S.*, *Sugahara M.* A Novel Induced-fit Reaction Mechanism of Asymmetric Hot Dog Thioesterase PaaI // J. Mol. Biol. 2005. V. 352. P. 212–228.
134. *Jakubowski H.*, *Guranowski A.* S-Adenosylhomocysteinase from yellow lupin seeds: stoichiometry and reactions of the enzyme-adenosine complex // Biochemistry. 1981. V. 20. P. 6877–6881.

135. *Smith D.W.*, *Fahrney D.E.* Catalysis by arginine deiminase: evidence for a covalent intermediate // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1978. V. 83. P. 101–106.

136. *Bakuleva N.P.*, *Baykov A.A.*, *Kasho V.N.*, *Nazarova T.I.*, *Avaeva S.M.* The flip-flop mechanism of the phosphorylation of yeast inorganic pyrophosphatase // Int. J. Biochem. 1983. V. 15. P. 849–854.

137. *Choate G.L.*, *Hutton R.L.*, *Boyer P.D.* Occurrence and significance of oxygen exchange reactions catalyzed by mitochondrial adenosine triphosphatase preparations // J. Biol. Chem. 1979. V. 254. P. 286–290.

138. *Grubmeyer C.*, *Penefsky H.S.* Cooperatively between catalytic sites in the mechanism of action of beef heart mitochondrial adenosine triphosphatase // J. Biol. Chem. 1981. V. 256. P. 3728–3734.

139. *Ackerman S.H.*, *Grubmeyer C.*, *Coleman P.S.* Evidence for catalytic cooperativity during ATP hydrolysis by beef heart F1-ATPase. Kinetics and binding studies with the photoaffinity label BzATP // J. Biol. Chem. 1987. V. 262. P. 13765–13772.

140. *Moudrianakis E.N.*, *Tiefert M.A.* Stability of bound ADP functioning as a phosphoryl donor in ATP synthesis by chloroplasts // J. Biol. Chem. 1979. V. 254. P. 9509–9517.

141. *Oliver D.*, *Jagendorf A.* Exposure of free amino groups in the coupling factor of energized spinach chloroplasts // J. Biol. Chem. 1976. V. 251. P. 7168–7175.

142. *Repke K.R.*, *Schon R.* Flip-flop model of (NaK)-ATPase function // Acta Biol. Med. Ger. 1973. V. 31. Suppl. P. K19-30.

143. *Stein W.D.*, *Lieb W.R.*, *Karlish S.J.*, *Eilam Y.* A modle for active transport of sodium and potassium ions as mediated by a tetrameric enzyme // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1973. V. 70. P. 275–278.

144. *Cantley L.C. Jr.* Cantley L.G., Josephson L. A characterization of vanadate interactions with the (Na,K)-ATPase. Mechanistic and regulatory implications // J. Biol. Chem. 1978. V. 253. P. 7361–7368.

145. *Eckert K.*, *Grosse R.*, *Levitsky D.O.*, *Kuzmin A.V.*, *Smirnov V.N.*, *Repke K.R.* Determination and functional significance of low affinity nucleotide sites of $Ca^{2+}+Mg^{2+}$-dependent ATPase of sarcoplasmic reticulum // Acta Biol. Med. Ger. 1977. V. 36. P. K1-10.

146. *Froehlich J.P.*, *Taylor E.W.* Transient state kinetic studies of sarcoplasmic reticulum adenosine triphosphatase // J. Biol. Chem. 1975. V. 250. P. 2013–2021.

147. *Kuo D.J.*, *Jordan F.* Active site directed irreversible inactivation of brewers' yeast pyruvate decarboxylase by the conjugated substrate analogue (E)-4-(4-chlorophenyl)-2-oxo-3-butenoic acid: development of a suicide substrate // Biochemistry. 1983. V. 22. P. 3735–3740.

148. *Tagaki W.*, *Guthrie J.P.*, *Westheimer F.H.* Acetoacetate decarboxylase. Reaction with acetopyruvate // Biochemistry. 1968. V. 7. P. 905–913.

149. *O'Leary M.H.*, *Westheimer F.H.* Acetoacetate decarboxylase. Selective acetylation of the enzyme // Biochemistry. 1968. V. 7. P. 913–919.

150. *Grazi E.*, *Trombetta G.*, *Lanzara V.* Fructose-1,6-bisphosphate-aldolase from rabbit muscle. Half of the sites reactivity at low temperature // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1983. V. 110. P. 578–583.

151. *Teng-Leary E.*, *Kohlhaw G.B.* Binding of alpha-ketoisovalerate to alpha-isopropylmalate synthase. Half-of-the-sites and all-of-the-sites availability // Biochim. Biophys. Acta. 1975. V. 410. P. 210–219.

152. *Seehra J.S.*, *Jordan P.M.* 5-Aminolevulinic acid dehydratase: alkylation of an essential thiol in the bovine-liver enzyme by active-site-directed reagents // Eur. J. Biochem. 1981. V. 113. P. 435–446.

153. *Jaffe E.K.*, *Hanes D.* Dissection of the early steps in the porphobilinogen synthase catalyzed reaction. Requirements for Schiff's base formation // J. Biol. Chem. 1986. V. 261. P. 9348–9353.

154. *Johnston M.*, *Jankowski D.*, *Marcotte P.*, *Tanaka H.*, *Esaki N.*, *Soda K.*, *Walsh C.* Suicide inactivation of bacterial cystathionine gamma-synthase and methionine gamma-lyase during processing of L-propargylglycine // Biochemistry. 1979. V. 18. P. 4690–4701.

155. *Weintraub H.*, *Vincent F.*, *Baulieu E.E.*, *Alfsen A.* Interaction of steroids with Pseudomonas testosteroni 3-oxosteroid delta4–delta5-isomerase // Biochemistry. 1977. V. 16. P. 5045–5053.

156. *Willard H.F.*, *Rosenberg L.E.* Interactions of methylmalonyl CoA mutase from normal human fibroblasts with adenosylcobalamin and methylmalonyl CoA: evidence for non-equivalent active sites // Arch. Biochem. Biophys. 1980. V. 200. P. 130–139.

157. *Jakes R.*, *Fersht A.R.* Tyrosyl-tRNA synthetase from Escherichia coli. Stoichiometry of ligand binding and half-of-the-sites reactivity in aminoacylation // Biochemistry. 1975. V. 14. P. 3344–3350.

158. *Fersht A.R.*, *Ashford J.S.*, *Bruton C.J.*, *Jakes R.*, *Koch G.L.*, *Hartley B.S.* Active site titration and aminoacyl adenylate binding stoichiometry of aminoacyl-tRNA synthetases // Biochemistry. 1975. V. 14. P. 1–4.

159. *Degtyarev S.K.*, *Beresten S.F.*, *Denisov A.Yu.*, *Lavrik O.I.*, *Kisselev L.L.* Negative cooperativity in adenylate formation catalysed by beef pancreas tryptophanyl-tRNA synthetase: influence of tRNATrp // FEBS Lett. 1982. V. 137. P. 95–99.

160. *Favorova O.O.*, *Madoyan I.A.*, *Drutsa V.L.* «Half-site» affinity modification of tryptophanyl-tRNA synthetase leads to «freezing» of the free subunit // FEBS Lett. 1981. V. 123. P. 161–164.

161. *Moe J.G.*, *Piszkiewicz D.* Isoleucyl transfer ribonucleic acid synthetase. Steady-state kinetic analysis // Biochemistry. 1979. V. 18. P. 2804–2810.

162. *Fersht A.R.* Demonstration of two active sites on a monomeric aminoacyl-tRNA synthetase. Possible roles of negative cooperativity and half-of-the-sites reactivity in oligomeric enzymes // Biochemistry. 1975. V. 14. P. 5–12.

163. *Blanquet S.*, *Iwatsubo M.*, *Waller J.P.* The mechanism of action of methionyl-tRNA synthetase from Escherichia coli. 1. Fluorescence studies on tRNAMet binding as a function of ligands, ions and pH // Eur. J. Biochem. 1973. V. 36. P. 213–226.

164. *Kosakowski H.M.*, *Bock A.* Substrate complexes of phenylalanyl-tRNA synthetase from Escherichia coli // Eur. J. Biochem. 1971. V. 24. P. 190–200.

165. *Fasiolo F.*, *Ebel J.P.*, *Lazdunski M.* Non-equivalence of the sites of yeast phenylalanyl-tRNA synthetase during catalysis // Eur. J. Biochem. 1977. V. 73. P. 7–15.

166. *Gillet S.*, *Hoang C.B.*, *Schmitter J.M.*, *Fukui T.*, *Blanquet S.*, *Hountondji C.* Affinity labeling of Escherichia coli histidyl-tRNA synthetase with reactive ATP analogues. Identification of labeled amino acid residues by matrix assisted laser desorption-ionization mass spectrometry // Eur. J. Biochem. 1996. V. 241. P. 133–41.

167. *Vogel H.J.*, *Bridger W.A.* An n.m.r. probe of succinyl-coenzyme A synthetase: subunit interactions and the mechanism of action // Biochem. Soc. Trans. 1983. V. 11. P. 315–323.

168. *Hersh L.B.*, *Surendranathan K.K.* Reaction of malate thiokinase with methoxycarbonyl-CoA disulfide. Evidence for half-of-the-sites reactivity // J. Biol. Chem. 1982. V. 257. P. 11633–11638.

169. *Rhee S.G.*, *Chock P.B.*, *Wedler F.C.*, *Sugiyama Y.* Subunit interaction in unadenylylated glutamine synthetase from Escherichia coli. Evidence from methionine sulfoximine inhibition studies // J. Biol. Chem. 1981. V. 256. P. 644–648.

170. *Kim K.H.*, *Rhee S.G.* Subunit interaction elicited by partial inactivation with L-methionine sulfoximine and ATP differently affects the biosynthetic and gamma-glutamyltransferase reactions catalyzed by yeast glutamine synthetase // J. Biol. Chem. 1987. V. 262. P. 13050–13054.
171. *Tate S.S.*, *Leu F.Y.*, *Meister A.* Rat liver glutamine synthetase. Preparation, properties, and mechanism of inhibition by carbamyl phosphate // J. Biol. Chem. 1972. V. 247. P. 5312–5321.
172. *Levitzki A.*, *Stallcup W.B.*, *Koshland D.E. Jr.* Half-of-the-sites reactivity and the conformational states of cytidine triphosphate synthetase // Biochemistry. 1971. V. 10. P. 3371–3378.
173. *Oesterhelt D.*, *Bauer H.*, *Kresze G.B.*, *Steber L.*, *Lynen F.* Reaction of yeast fatty acid synthetase with iodoacetamide. 1. Kinetics of inactivation and extent of carboxamidomethylation // Eur. J. Biochem. 1977. V. 79. P. 173–180.
174. *Clements P.R.*, *Barden R.E.*, *Ahmad P.M.*, *Ahmad F.* Affinity labeling of fatty acid synthetase from lactating rat mammary gland with S-(4-bromo-2,3-dioxobutyl)-CoA: evidence for a «half-of-the-sites» catalytic mechanism // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1979. V. 86. P. 278–284.
175. *Smith S.*, *Stern A.* Mammalian fatty-acid synthetase is a structurally symmetrical but functionally asymmetrical dimmer // Fed. Proc. 1983. V. 42. P. 1845.
176. *Наградова Н.К.*, *Муронец В.И.* Белок-белковые взаимодействия в функционировании пиридиннуклеотид-зависимых дегидрогеназ // Успехи биол. хим. — М.: Наука, 1985. Т. 26. С. 83–107.
177. *Penning T.M.*, *Westbrook E.M.*, *Talalay P.* On the number of steroid-binding sites of delta 5-3-oxosteroid isomerase // Eur. J. Biochem. 1980. V. 105. P. 461–469.
178. *Singh N.*, *Wakil S.J.*, *Stoops J.K.* On the question of half- or full-site reactivity of animal fatty acid synthetase // J. Biol. Chem. 1984. V. 259. P. 3605–3611.
179. *Новиков В.П.* Триггерная модель мышечного сокращения // Успехи соврем. биол. 1983. Т. 96. С. 255–268.
180. *Stefanov V.E.*, *Karasev V.A.* Flip-flop mechanism in the enzymatic catalysis: model for kinetic description or physical reality? // An. Quim. 1990. V. 86. P. 903–909.
181. *Wolodko W.T.*, *O'Connor M.D.*, *Bridger W.A.* Capacity for alternating sites cooperativity in catalysis by succinyl-coenzyme A synthetase // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1981. V. 78. P. 2140–2144.
182. *Garavito R.M.*, *Berger D.*, *Rossman M.F.* Molecular asymmetry in an abortive ternary complex of lobster glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase // Biochemistry. 1977. V. 16. P. 4393–4398.
183. *Steitz T.A.*, *Fletterick R.J.*, *Hwang K.J.* Structure of yeast hexokinase. II. A 6 angstrom resolution electron density map showing molecular shape and heterologous interaction of subunits // J. Biol. Chem. 1973. V. 78. P. 551–561.
184. *Nichols C.E.*, *Dhaliwal B.*, *Lockyer M.*, *Hawkins A.R.*, *Stammers D.K.* High-resolution structures reveal details of domain closure and «half-of-sites-reactivity» in Escherichia coli aspartate beta-semialdehyde dehydrogenase // J. Mol. Biol. 2004. V. 341. P. 797–806.
185. *Valencia E.*, *Larroy C.*, *Ochoa W.F.*, *Pares X.*, *Fita I.*, *Biosca J.A.* Apo and Holo structures of an NADPH-dependent cinnamyl alcohol dehydrogenase from Saccharomyces cerevisiae // J. Mol. Biol. 2004. V. 341. P. 1049–1062.
186. *Карасев В.А.*, *Стефанов В.Е.* Эволюционный структурно-функциональный подход к надмолекулярным биоструктурам // Успехи биол. химии. — М.: Наука, 1991. Т. 32. С. 114–145.
187. *Руденко А.П.* Теория саморазвития отрытых каталитических систем. — М.: Изд. Моск. ун-та, 1969. — 272 с.
188. *Руденко А.П.* Эволюционная химия и естественно-исторический подход к проблеме происхождения жизни // Журн. ВХО им. Д.И. Менделеева. 1980. Т. 25. С. 390–404.

189. *Опарин А.И.* Жизнь, ее природа, происхождение и развитие. — М.: Наука, 1968. — 173 с.
190. *Кальвин М.* Химическая эволюция. — М.: Мир, 1971. — 240 с.
191. *Эйген М.* Самоорганизация материи и эволюция биологических молекул. — М.: Мир, 1973. — 216 с.
192. *Кастлер Г.* Возникновение биологической организации. — М.: Мир, 1967. — 90 с.
193. *Семионеску К., Денеш Ф.* Проихождение жизни. Химические теории. — М.: Мир, 1986. — 120 с.
194. *Фокс С., Дозе К.* Молекулярная эволюция и возникновение жизни. — М.: Мир, 1975. — 374 с.
195. *Руденко А.П.* Самоорганизация и прогрессивная эволюция в природных процессах в аспекте концепции эволюционного катализа. — Рос. Хим. Ж. 1995. Т. 39. С. 55–71.
196. *Бауэр Э.С.* Теоретическая биология. — М.–Л.: ВИЭМ, 1935. — 205 с.
197. *Шредингер Э.* Что такое жизнь? — М.: Атомиздат, 1972. — 88 с.
198. *Бриллюэн Л.* Наука и теория информации. — М.: Физматгиз, 1960. — 392 с.
199. *Бернал Дж.* Возникновение жизни. — М.: Мир, 1969. — 356 с.
200. *Карасев В.А., Стефанов В.Е.* Рекомбинация и отбор активных дуплицированных структур как возможный путь предбиологической эволюции ферментов // Ж. эвол. биох. физиол. 1986. Т. 22. С. 226–232.
201. *Karasev V.A., Stefanov V.E.* Origin of oligomeric enzymes: population-template model // In: Evolutionary Biochemistry and Related Areas of Physicochemical Biology / Ed. B. Poglasov et al. — M.: Bach Institute of Biochemistry and ANKO, 1995. P. 337–407.
202. *Кизель В.А.* Физические принципы диссимметрии живых систем. — М.: Наука, 1985. — 119 с.
203. *Хильчевская Р.Н.* Роль асимметрии-симметрии вещества в процессах возникновения жизни на Земле // Журн. ВХО им. Д.И. Менделеева. 1980. Т. 25. С. 418–423.
204. *Norden B.* The asymmetry of life // J. Molec. Evol. 1978. V. 11. P. 313–332.
205. *Илиел Э.Л.* Стереохимия соединений углерода. — М.: Мир, 1965. — 460 с.
206. *Hanson K.R.* Enzyme symmetry and enzyme stereospecificity // Annu. Rev. Plant Physiol. 1972. V. 23. P. 335–366.
207. *Karasev V.A., Stefanov V.E.* Topological nature of the genetic code // J. Theor. Biol. 2001. V. 209. P. 303–317.
208. *Телегина Т.А., Павловская Т.Е.* Катализ маленин-меланоидинового типа в абиогенезе пептидов // Изв. АН СССР. Сер. биол. 1988. № 1. С. 112–117.
209. *Pecht-Horovotz M., Katchalsky A.* Synthesis of aminoacyladenylates under prebiotic conditions // J. Molec. Evol. 1973. V. 2. P. 91–97.

Глава 11

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕМБРАНЫ — БОЛЬШИЕ ИНТЕГРАЛЬНЫЕ СТРУКТУРЫ

В предыдущей главе с позиции концепции ССИВС была предложена и подробно обоснована структурно-функциональная модель олигомерных катализаторов — простейших молекулярных процессоров, осуществляющих во времени структурные преобразования органических молекул. Следующим уровнем сложности, по-видимому, максимальным на молекулярном уровне, может быть построение из отдельных процессоров большой интегральной структуры (БИС). В технике большие интегральные схемы, как правило, имеют планарную структуру. Отдельные элементы этой схемы расположены на двумерной плоскости и соединены протяженными линиями коммутации. На молекулярном уровне большие интегральные структуры могут быть сконструированы в виде уплощенных структур (мембран), на которых отдельные процессоры соединены между собой с помощью специальных молекул в интегральное целое. В молекулярной биологии такими структурами являются биомембраны, надмолекулярные клеточные комплексы, содержащие в своем составе белки, нуклеиновые кислоты, фосфолипиды (ФЛ), полисахариды.

Как и ранее, в начале главы будет описана, исходя из теоретических требований и возможностей концепции ССИВС, возможная структура мембран, выполняющих функцию БИС, а затем будет предложена модель биомембран.

С позиции нашей концепции будут проанализированы структурные данные по биомембранам, известные к настоящему времени в литературе. Этому будет предшествовать исторический обзор, поскольку развитие представлений о структуре биомембран имеет достаточно длительную историю. В конце главы будут изложены результаты экспериментальных исследований, полученные Центре микротехнологий и диагностики (ЦМИД), идейной основой которых явились развитые нами представления о структуре и функциях биомембран.

11.1. Зонно-блочная модель мембранных структур на основе ССИВС

Основными принципами нашей концепции, как они были сформулированы в разделах 5.1 и 5.2, являются: принцип непрерывности ССИВС при построении надмолекулярных бионических (в том числе и биологических) структур и принцип сопряжения через водородную связь при переносе зарядов по ССИВС в этих структурах. В мембранных структурах, которые функционируют как БИС, эти принципы также должны быть реализованы в полной мере.

Используя развитые в предыдущих главах представления и модели, мы попытаемся представить, как должна быть устроена мембрана — БИС и как она должна функционировать. Отметим, что хотя общий вывод этой структуры носит универсальный

характер и может относиться к любым органическим мембранам, построенным на принципах ССИВС, в первую очередь мы относим его, как и предыдущие модели, к биологическим мембранам, которые являются представителем реально существующих клеточных структур.

11.1.1.1. ***Выделение зон ССИВС ближнего и дальнего порядка.*** В технических интегральных схемах процесс переноса зарядов обеспечивают линии коммутации ближнего и дальнего порядка. Линии коммутации ближнего порядка предназначены для связи внутри функциональных блоков, а дальнего порядка — для связи между блоками. По аналогии с большими интегральными схемами, мембранные структуры–БИС, построенные на непрерывных ССИВС, также должны содержат зоны ближнего и дальнего порядка. При этом наша модель мембранных структур должна учитывать требования, предъявляемые к структурам, содержащим ССИВС, сформулированные в разделе 5.2.4.

Во-первых, для эффективного переноса зарядов эти структуры должны обеспечивать их изоляцию ССИВС от окружающей водной среды, т. е. формировать плотное гидрофобное окружение, в котором проложены ССИВС.

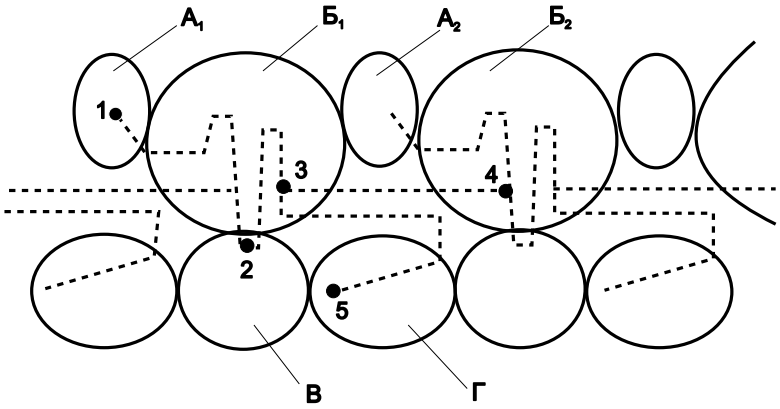


Рис. 11.1. Два типа зон, предполагаемых в модели мембранных структур на основе ССИВС. Зоны 1–2 и 2–3, соединяющие глобулы А и В — ближнего порядка; зона 3–4 между структурами $Б_1$ и $Б_2$ и зона 3–5 между $Б_1$ и Г — дальнего порядка

На рис. 11.1 эти системы расположены внутри мембранной структуры, причем внутри отдельных глобул содержатся ССИВС ближнего порядка (зоны 1–2 и 2–3), а в центре располагаются зоны ССИВС, обеспечивающие связь структур (зоны 3–4 и 3–5).

Во-вторых, входы и выходы ССИВС должны располагаться в структурах так, чтобы быть доступными для доноров и акцепторов. Например, начало ССИВС (1) на глобуле А и конец ССИВС (5) на глобуле Д могут служить местом присоединения доноров и акцепторов зарядов. При этом среда, в которой находятся доноры и акцепторы, должна обеспечивать их достаточную подвижность. Идеальной средой для этого является вода.

В третьих, должна существовать термодинамическая обратимость процесса переноса зарядов по ССИВС. Этот аспект модели реализуется с помощью олигомерного

строения и симметрии глобул, образующих мембрану и приводит к блочному строению (см. далее).

11.1.1.2. ***Молекулы, обеспечивающие формирование зон дальнего порядка.*** Если в вопросе зон ССИВС ближнего порядка все более-менее ясно и их состав должен быть аналогичен тому, с которым мы имели дело при построении молекулярных процессоров, то к зонам дальнего порядка, по-видимому, предъявляются дополнительные требования, а именно: энергетические возможности для переноса зарядов в них должны быть выше. Кроме того, как видно на рис. 11.1, отдельные глобулы с той и другой стороны довольно слабо скреплены между собой и возникает необходимость для введения специальных молекул, типа скрепок, к которым бы они прикреплялись. Эти два требования можно совместить, если эти специальные молекулы смогут, с одной стороны, формировать протяженные зоны ССИВС, а с другой — иметь неполярные группировки, к которым могли бы прикрепляться глобулы. Вид таких предполагаемых молекул в мембранной структуре показан на рис. 11.2.

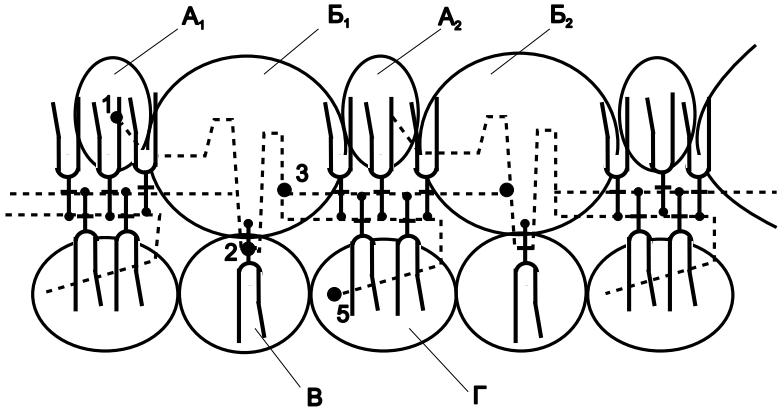


Рис. 11.2. Расположение предполагаемых бифункциональных молекул, обеспечивающих формирование зон ССИВС и связь между глобулами в мембранной структуре

На рисунке видно, что такие молекул могут участвовать как в формировании ССИВС ближнего порядка, например, точки 2 в глобуле В, так и зон дальнего порядка, обеспечивая одновременной скрепление глобулярных структур по разные стороны мембраны (например, глобул $А_2$ и Г).

11.1.2.1. ***Формирование двумерных структур мембран.*** Вспомним, что молекулярные процессоры, построенные на основе ССИВС, должны быть организованы как олигомерные структуры, т. е. состоять из отдельных субъединиц, число которых, как правило, четно.

Рассмотрим контакты субъединиц димерных структур. Предположим, что мы имеем димер $А_1А_1'$ (рис. 11.3, *а*), который имеет внутренние контакты k_1–k_2' между субъединицами $А_1$ и $А_1'$ (как частный случай это могут быть выходы и входы ССИВС, связывающие активные центры белка). Если приять во внимание симметрию $С_2$ димера, то аналогичные контакты буду возникать между $А_1'$ и $А_1$ (k_2–k_1'). Аналогичные внутренние контакты могут существовать в димере $В_1В_1'$, также имеющем симметрия $С_2$(рис. 11.3, *б*), которые мы, для простоты, рассматривать не

будем. Допустим, далее, что субъединица A_1 имеет внешний контакт с субъединицей B_1, который обозначен как k_3–k_4(рис. 11.3, *в*). В силу симметрии C_2, аналогичный контакт будет иметь субъединица B_1' с субъединицей A_2' (k_3'–k_4') белка A_2A_2'. Аналогичный контакт k_3'–k_4' может возникнуть между субъединицами A_1' и B_2' белка B_2B_2' и т. д. Эта периодичность будет возникать в направлении оси X в комплексе AA′–BB′, который формирует элементарный дуплицированный блок, состоящий из двух белков (выделен стрелками). Аналогичная периодичность, в силу симметрии контактов олигомерных белков, может возникать в направлении оси Y.

Поэтапное формирование двумерной структуры для белка, имеющего три грани (A, B, C), показано на рис. 11.4. На первом этапе (рис. 11.4, *б*) происходит образование димеров из отдельных субъединиц по граням A (контакты k_1 и k_2).

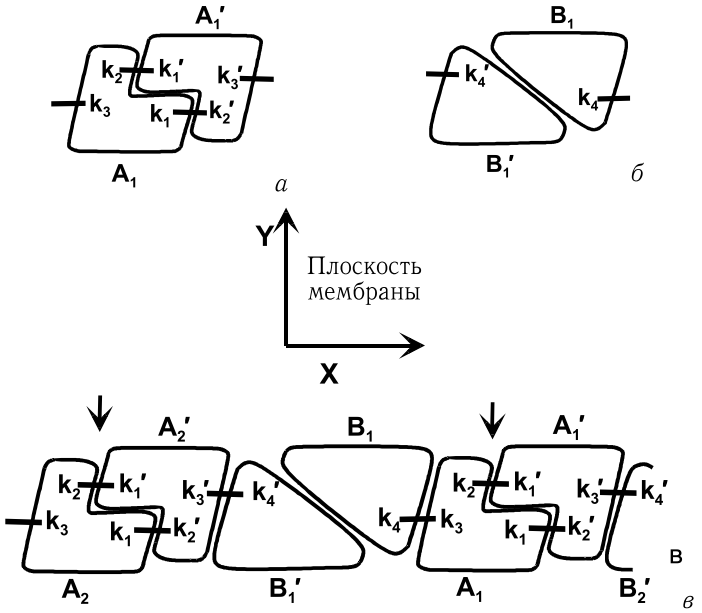


Рис. 11.3. Возникновение двумерной периодичности в мембранных БИС, построенных из олигомерных структур: *а*, *б* — варианты контактов в димерных структурах; *в* — формирование периодичного блока из двух белков вдоль оси X

Для различения субъединиц в димере одна из них заштрихована. На втором этапе идет вытянутых цепных структур за счет образования контактов по грани B (рис. 11.4, *в*, контакты k_3 и k_4). И, наконец, на третьем этапе цепные структуры объединяются в двумерные с формированием контактов по граням C (рис. 11.4, *в*, контакты k_5 и k_6). При этом, из различия контактов субъединиц (замкнуты или разомкнуты), эта структура может находиться, как показано на рисунке, в одном из двух состояний. В результате мы получили двумерную структуру, в которой благодаря наличию трех граней образуются функциональные блоки с симметрией C_6.

В зависимости от конфигурации исходных субъединиц и комплексов, образованных отдельными субъединицами (как идентичными, так и различающимися между собой по структуре и функциональным свойствам), могут получены двумерные структуры с различными типами симметрии (C_2, C_3, C_6 и т. д.). Примеры

абстрактных структур, образованных идентичными субъединицами, показаны на рис. 11.5, *а–в*, а состоящих из двух различных типов субъединиц — на рис. 11.5, *г*.

Таким образом, двумерные мембранные структуры будут возникать всякий раз, когда входящие в нее субъединицы объединены в комплексы, имеющие циклическую группу симметрии C_n одной осью симметрии n-го порядка, перпендикулярной плоскости этих структур. При этом наиболее часто встречающимися должны быть структуры с осями третьего и шестого порядка.

11.1.2.2. *Функционирование блоков. Двумерные структуры мембран как активные среды.* Как следует из моделей переноса зарядов и работы олигомерных процессоров, структуры, построенные на основе ССИВС должны работать попеременно, в режиме «флип-флоп». Чтобы представить, как будут работать блоки в составе мембранных структур, рассмотрим для начала модель, в которой контактируют две структуры (рис. 11.6.). Одна из них — фермент, расщепляющий молекулы D — источники заряда (например, гидролизующий молекулы нуктеотидтрифосфатов — НТФ), а другая — переносчик молекул S через мембрану, промежуточный акцептор заряда, использующий энергию НТФ для обратимых конформационных переходов.

Предположим, что ССИВС связывают активные центры донорной структуры и промежуточного акцептора. Молекула донора D^1, в результате катализа субъединице B_1 структуры B_1B_2 распадается на D' и P_i. Выделяющийся заряд, в виде сигнала направляется через контакты ${k^1}_1$–k^1_2 в димер A_1A_2 переносчика и запускает цепь конформационных переходов в последней (рис. 11.6, *а*). Субъединицы B_1 и A_1 образуют при этом комплекс (показан штриховкой). Контакты ${k^2}_2$ — ${k^{1'}}_1$, связывающие субъединицу A_2 с димером $B_1'B_2'$, являются при этом разомкнутыми (молекулы A_2 и B_1' не заштрихованы). В результате структурных изменений димера A_1A_2 молекула S^1 переносится от субъединицы A_2 к A_1, а молекула S^2 выбрасывается с другой стороны мембраны (рис. 11.6, *б*). Синхронно с этим процессом происходит замена распавшейся молекулы донора в субъединице B_1 на D^1 и замыкание контактов ${k^2}_2$–${k^{1'}}_1$, что обеспечивает доступ сигнала к молекуле $D^{1'}$, являющейся, согласно модели катализа (см. раздел 10.1.4), конечным акцептором заряда. Этот сигнал инициирует распад молекулы $D^{1'}$, в результате чего начинается стадия *в* (рис. 11.6, *г*), симметричная стадии *а*. Через стадию *г* структура возвращается к исходному состоянию.

В результате происшедшего цикла наблюдается поочередная работа субъединиц переносчика, работу которого обслуживают две субъединицы структур — доноров зарядов. Если предположить, что донорная структура является димером (рис. 11.6 — B_2, B_2'), то, в силу симметрии, вторая ее субъединица также должна обслуживать переносчик. При этом обе субъединицы донорной структуры, даже если они независимы друг от друга, также должны работать в колебательном режиме. Комплекс из молекул доноров заряда (B_1, B_1') и двух молекул переносчиков (A_1A_2) можно рассматривать в качестве функционального димера, работающего в колебательном режиме. В целом модель мембранной структуры предполагает, что в состав субъединицы функционального димера может входить несколько различных структур.

Если в качестве блоков рассматривать структуры субъединиц (рис. 11.4.), то двумерная структура таких субъединиц, работающих в колебательном режиме, будет иметь два состояния (рис. 11.7). Такую структуру можно рассматривать в качестве

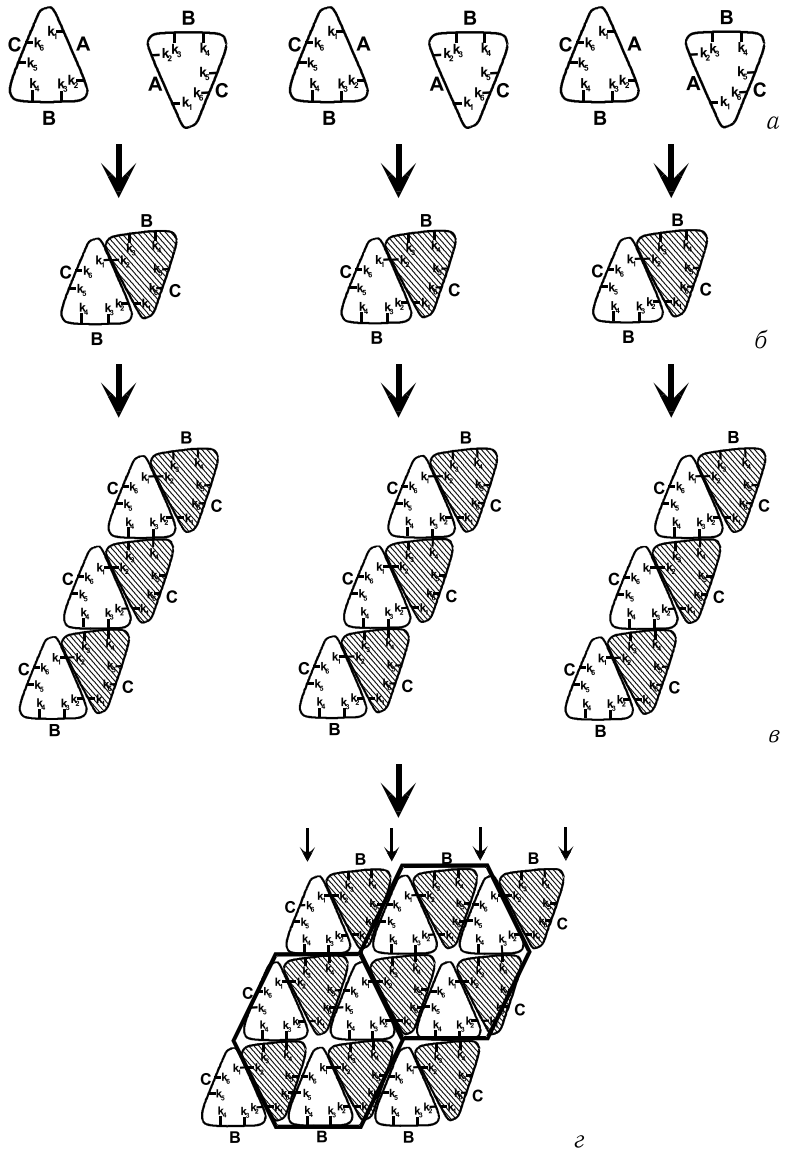


Рис. 11.4. Формирование двумерной мембранной структуры из субструктур, имеющих три близких по форме грани (A, B и C)

активной двумерной среды [1, 2]. Свойства активных сред будут рассмотрены более подробно несколько ниже.

11.1.3. Асимметрия двумерной структуры мембран. Проводя дальнейшую аналогию между мембранными структурами — БИС и техническими интегральными схемами примем во внимание, что на этих схемах отдельные функциональные блоки расположены по-разному с одной и другой стороны плоскости. Это связано с различиями в окружении с одной и другой стороны плоскости схемы. Различия

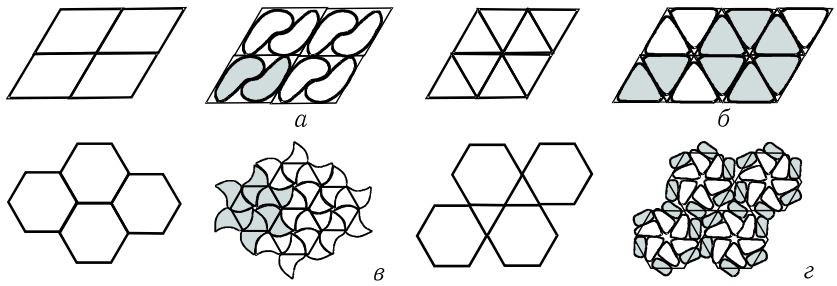


Рис. 11.5. Варианты формирования двумерных мембранных структур с различными типами симметрии: *а* — C_2, из одинаковых субъединиц неправильной формы; *б* — C_6 из треугольных субъединиц, имеющих одинаковые грани; *в* — C_6 из субъединиц неправильной формы; *г* — C_6 из двух типов субъединиц, образующих функциональный ансамбль

в микроокружении по разные стороны мембранных структур (например, в клеточных компартментах биомембран) приводят к таким же особенностям мембранных БИС. Это означает, что модель мембранных структур должна обладать асимметрией, как в своей организации, так и по функциональным свойствам. На рис. 11.1 показана была модель мембранной структуры, обладающая такой асимметрией. На рисунке видно, что глобулы типа А и Б располагаются с одной стороны мембранной структуры, а глобулы типа В и Г– с другой стороны.

11.1.4. Обобщенная модель мембранных структур на основе ССИВС. Выше мы рассмотрели отдельные особенности модели мембранных структур, которая возникает при ее построении на основе концепции ССИВС. Все эти особенности, в обобщенном виде представлены на рис. 11.8.

Как видно на этом рисунке, вся структура пронизана зонами ССИВС, причем часть из них работает внутри структур (зоны ближнего порядка) и выделена прямоугольниками, соответствующими спиральным фрагментам этих структур. Другая часть зон связывает отдаленные структуры (зоны дальнего порядка). Последние, как видно на схеме, частично сформированы за счет «шпилечных» молекул, выполняющих двойную функцию: с одной стороны, они формируют зоны ССИВС, а с другой — скрепляют отдельные глобулярные структуры в единое целое. Обратите внимание, что «шпилечные» молекулы могут быть направлены полярными группами как внутрь структуры, так и наружу (см. заштрихованные и не заштрихованные глобулы рис. 11.8.). Главное, чтобы они при этом встраивались в структуру ССИВС. В свою очередь, глобулярные структуры состоят из симметричных субъединиц (показаны димеры), которые благодаря ориентации осей симметрии перпендикулярно плоскости мембраны, формируют двумерную активную среду, работающую в колебательном режиме.

На поверхности такой зонно-блочной структуры могут находиться и другие функциональные компоненты. Например, если такая мембранная структура имеет только один ярус, то она может быть покрыта полисахаридными компонентами, обеспечивающими ее устойчивость в гидрофильной среде (они показаны на рис. 10.8 в виде углеводных цепочек). Возможно прикрепление к ней или встраивание дополнительных олигомерных структур, обладающих, например, сенсорными функциями и т. д.

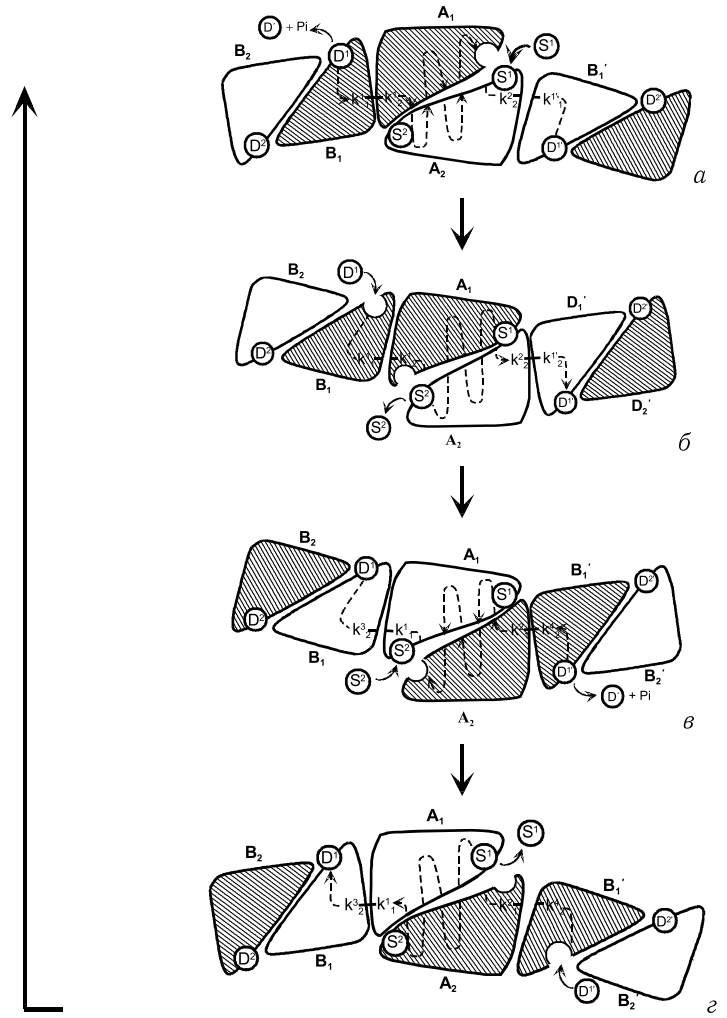


Рис. 11.6. Модель работы функционального димера (комплекса из двух белков): D — источники зарядов (нуклеотидтрифосфаты); S — переносимые молекулы

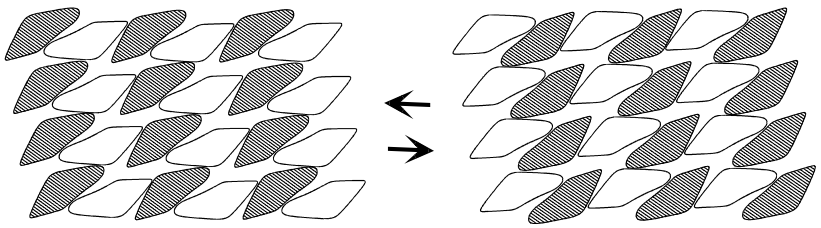


Рис. 11.7. Блочная структура мембран как двумерная активная среда

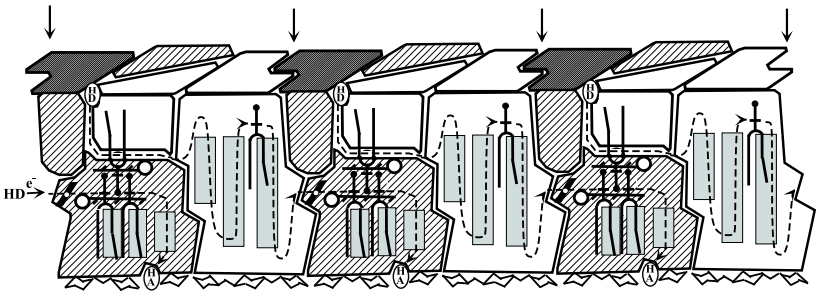


Рис. 11.8. Обобщенная зонно-блочная модель мембранных структур, построенная на основе ССИВС

11.2. Зонно-блочная модель биологических мембран: роль молекул фосфолипидов

Предложенная выше модель мембранных структур носит универсальный характер и может быть использована при конструировании искусственных мембран, работающих на основе ССИВС. Однако, нам известны реальные структуры, построенные на принципах ССИВС — биологические мембраны. Поэтому мы использовали ее для анализа структуры и функций биомембран.

Вопрос о периодичности структуры биомембран, вытекающей из симметрии олигомерной структуры белков более-менее понятен. В то же время, проблема ориентации молекул фофолипидов (ФЛ) и их функции в составе биомембран, несмотря на то, что зонный вариант модели был впервые предложен в работах [3, 4] более 30 лет назад, до сих пор с трудом поддается осознанию. По этой причине мы обратились к более детальному анализу функциональной роли ФЛ в биомембранах с позиции зонно-блочной модели, построенной на основе ССИВС.

11.2.1. Фосфолипиды как основа базовой архитектуры биомембран. Напомним, что биологические мембраны представляют собой комплекс, состоящий из белков, липидов (главным образом, ФЛ) и некоторых других компонентов. Как было показано в разделе 6.1.4, молекулы ФЛ могут рассматриваться как основа базовой архитектуры биомембран. Общий план их структуры полностью соответствует тем искомым молекулам-шпилькам, которые должны обладать бифункциональными свойствами — участвовать в формировании зон ССИВС ближнего и дальнего порядка и обеспечивать прикрепление отдельных белков к интегральной мембранной БИС.

В самом деле, полярные группы ФЛ могут служить основой для формирования трех зон ССИВС (см. раздел 6.1.4): в области аминогруппы фосфатидилэтаноламина (ФЭА); в области HO–P=O-групп, связывающих азотистые основания с диглицеридным остатками ФЛ; в области O–C=O-групп, через которые жирные кислоты связываются с глицерином ФЛ (табл. 6.1). Возникает вопрос, какие можно ожидать варианты непосредственно при построении модели биомембран.

11.2.2. Ориентация молекул фосфолипидов в структуре биомембран

При выборе варианта укладки молекул ФЛ в модели мембран мы приняли во внимание тот факт, в структуре биомембран липиды образуют бимолекулярный слой [5]. По этой причине существует всего две возможности ориентации ФЛ: биполярными группировками внутрь и наружу мембраны (рис. 11.9.).

В случае ориентации биполярных головок наружу мембраны, в окружающую среду противоположно заряженные $C–NH_3^+$- и $O–P=O^-$-группы не образуют ССИВС (рис. 11.9, *а*). Образование ССИВС на поверхности бислоя (рис. 11, *б*) является также невыгодным, так как ведет к контакту полярных групп с водой, что не удовлетворяет одному из требований механизма переноса зарядов по ССИВС (см. раздел 5.2.4). Эти варианты соответствуют представлениям, положенным в основу жидкостно-мозаичной модели биомембран [6]. Если отдельные молекулы ФЛ будут при этом

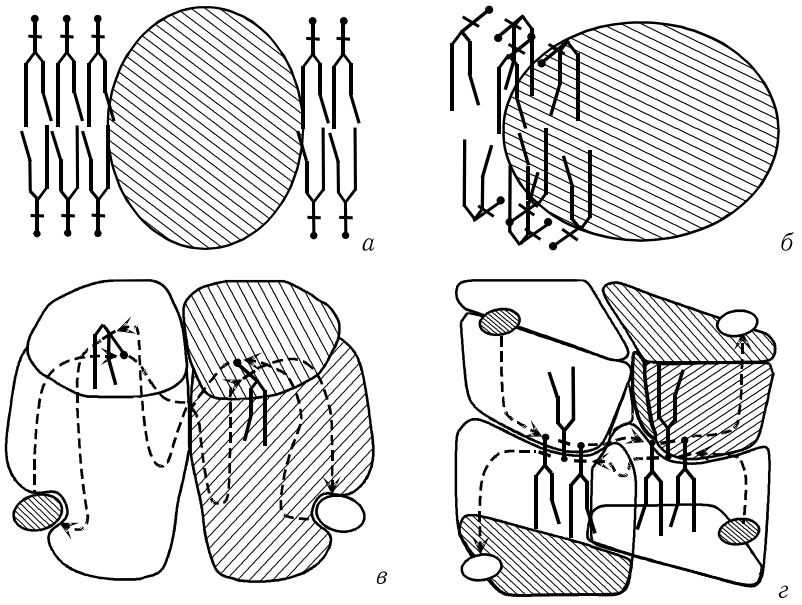


Рис. 11.9. Возможные варианты ориентации молекул фосфолипидов в биомембранах: *а*, *б*, *в* — биполярными головками наружу мембраны; *г* — биполярными головками внутрь структуры [6, 7]. $C–NH_3^+$ и $O–P=O^-$ на биполярной головке обозначены, соответственно, как черный кружок и черточка, ССИВС — пунктирные линии

целиком встроены в структуру белка (рис. 11, *в*), то их функциональные группы могут участвовать в ССИВС белка.

Альтернативный вариант позволяет укладываться биполярным головкам ФЛ перпендикулярно плоскости мембраны (рис. 11 *г*). В этом случае поочередно расположенные $C–NH_3^+$- и $O–P=O^-$-группы образуют квазиодномерные ССИВС, хотя теоретически возможно формирование и двумерных зон ССИВС. Чтобы удовлетворить требованиями минимизации гидрофобных контактов, на которых делался акцент в модели [5], цепи жирных кислот должны быть погружены в структуру белка. При этом, если изучать отдельные белки комплексов вместе с ФЛ (как на рис. 11 *г*), то может сложиться впечатление, что ФЛ ориентированы полярными группами в раствор. На самом деле это впечатление может быть ошибочным.

Отметим, что концепция ССИВС не накладывает жестких ограничений на ориентацию липидов в биомембранах — они могут быть уложены как биполярными группами к наружи мембраны так и внутрь (рис. 11.11 *в*, *г*). Главное условие, которое должно быть соблюдено — это участие функциональных групп ФЛ в составе ССИВС.

Этим наш подход существенно отличается от других моделей мембран. Например, в жидкостно-мозаичной модели [6] отсутствуют представления о ССИВС, а роль биполярных групп сводится к созданию гидрофильной поверхности биомембран.

11.2.2. Формирование зон ССИВС дальнего порядка. В работах [3, 4] был впервые отмечен факт, что биполярные головки молекул ФЭА, расположенные относительно друг друга на основе вращательной симметрии (C_2), могут образовать в центре биомембран двойные зоны ССИВС, состоящие из чередующихся C–NH- и HO–P=O-групп (рис. 11.11, *г*). Рассмотрим более подробно этот вариант, показанный на рис. 11.10.

Как видно из этого рисунка, группы ФЭА соседних монослоев ФЛ образуют две зоны ССИВС, состоящие из чередующихся C–NH_2 и HO–P=O-групп. Предполагается, что именно эти ССИВС являются зонами дальнего порядка, по которым в структуре биомембран осуществляется скачкообразный латеральный перенос зарядов. Протоны при этом переходят в сторону молекул доноров (HD^{1-}, HD^{2-}), а отрицательные заряды перемещаются в сторону акцепторов (HA^1, HA^2), что соответствует с модели, описанной в разделе 5.2.

Аналогичное расположение биполярных групп молекул фосфатидилхолина (ФХ), показанное на рис. 11.11, приводит к образованию зон ионных связей из чередующихся $C–N^+(CH_3)_3$ и $^{-\delta}O–P–O^{\delta-}$-групп. Возможная роль таких зон — формирование изолирующих прослоек для ССИВС.

Таким образом, предложенная ориентация биполярных группировок ФЭА и ФХ согласно нашей модели, устанавливает отношения между их молекулярной структурой и функцией в структуре биомембран. Фосфатные группы этих молекул, а так-

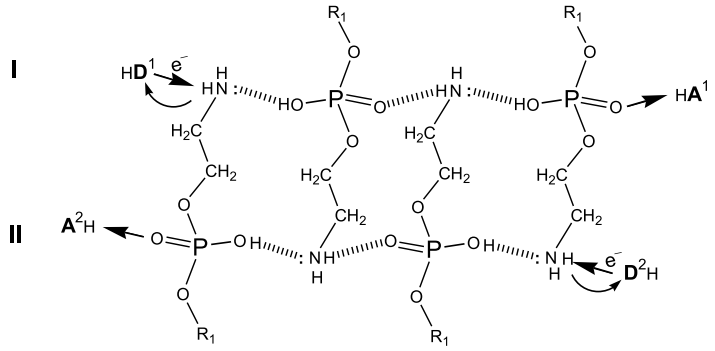


Рис. 11.10. Центральные зоны систем сопряженных ионно-водородных связей в зонно-блочной модели биомембран [3, 4]: HD^1, HD^2 — доноры, HA^1, HA^2 — акцепторы отрицательных зарядов; R_1–R_4 — диглицеридные остатки фосфолипидов

же аминогруппы ФЭА, участвуют в формировании зон ССИВС дальнего порядка, а холиновые группировки — обеспечивают образуют изолирующие прослойки между зонами ССИВС. Отметим, что поддержание асимметричного, неравновесного состояния протонов в зонах ССИВС требует постоянного их участия в процессах переноса зарядов от доноров к акцепторам. Это характеризует нашу модель как стабильно неравновесную, в отличие от других, термодинамически равновесных моделей [6–8], и сближает ее с представлениями о живых системах как стационарно неравновесных [9].

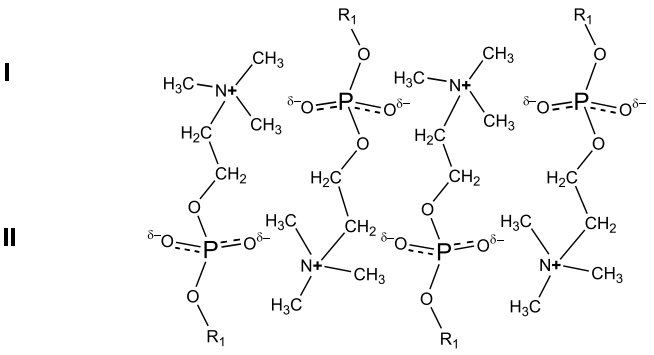


Рис. 11.11. Системы ионных связей в зонно-блочной модели биомембран, сформированные биполярными головками фосфатидилхолина

11.2.3.1. ***Область биполярных группировок фосфолипидов.*** Формирование зон из биполярных групп ФЛ не исключает, а наоборот, предполагает их связь с ССИВС белков. Это видно уже на рис. 11.9, *г*. В этих зонах ССИВС могут участвовать как полярные группы боковых цепей аминокислот, например, C–NH-группы лизина и HN–C=N-группы аргинина, так и системы HN–C=O-групп пептидных связей α-спиральных и β-структурных фрагментов белков. Гипотетический вариант такого перехода показан на рис. 11.12. В данном варианте молекула HD^1 через C–NH и HO–P=O-группы системы I, HN–C=N-группы аминокислоты Arg и

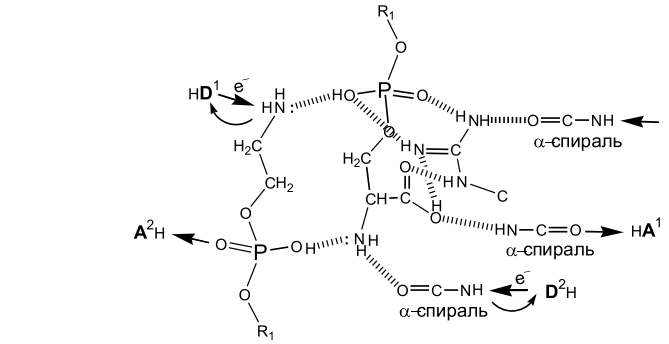


Рис. 11.12. Возможный вариант взаимосвязи центральных зон ССИВС молекул фосфолипидов (показан фосфатидилсерин) с белком

O=C–OH-группу фосфатидилсерина (ФС), а также через систему HN–C=O-групп α-спирали связана с молекулой A^1. В то же время, молекула HD^2 системы II, как показано на рисунке, может быть связана с молекулой A^2H через HN–C=O-группу α-спирали и C–NH и HO–P=O-группы молекул ФЛ.

11.2.3.2. ***Область связи жирных кислот со спиртами.*** Из табл. 6.1 следует, что зоны ССИВС могут формироваться не только в области биполярных группировок ФЛ, но и в области связи жирных кислот со спиртом (глицерином и сфингозином). Из рисунков 11.9, *б–г* следует, что молекулы ФЛ могут быть погружены внутрь структуры белка. Это означает, что данная область, также как и биполярные группы, могут участвовать во взаимодействии с белком. Как показано на рис. 11.13, суще-

ствует большое разнообразие типов связей в этой области. С позиции модели [6] факт разнообразия типов связей жирных кислот в ФЛ не находит какого-либо рационального объяснения.

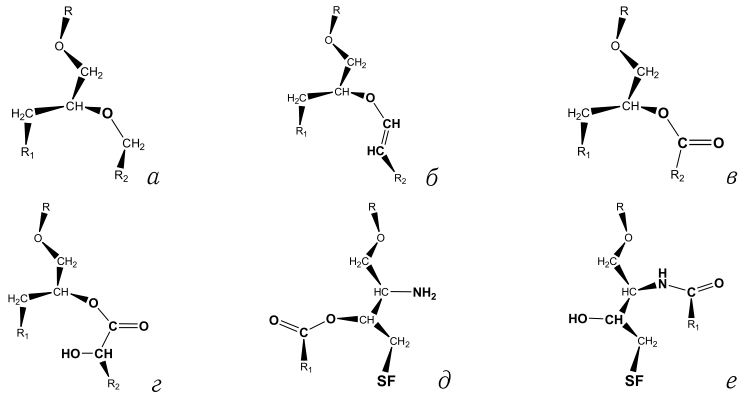


Рис. 11.13. Варианты связей жирных кислот в молекулах липидов. Диглицериды: *а* — простая эфирная; *б* — винильноэфирная (R_2); *в*–сложноэфирная; *г* — сложноэфирная с β-оксикислотой; сфинголипиды (SF): *д* — сложноэфирная и свободная аминогруппа; *е* — пептидная и свободная оксигруппа

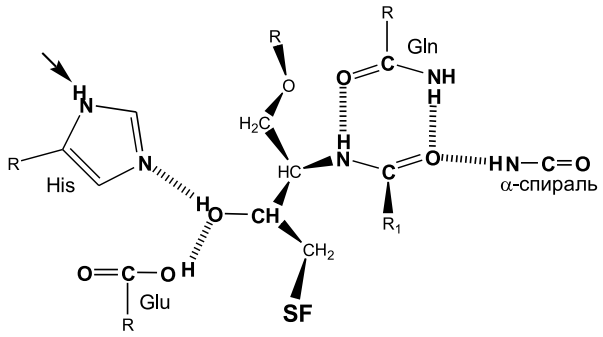


Рис. 11.14. Возможный вариант включения сфинголипида (рис. 11.13, *д*) в структуру ССИВС белка

В работе [10] нами была рассмотрена возможность связывания в этой области молекул ФЛ с полярными группами белков. В качестве одного из вариантов встраивания ФЛ в структуру ССИВС на рис. 11.14 показана молекула сфингомиелина, у которой аминогруппа образует пептидную связь (HN–C=O-группу) с жирной кислотой R_1, а C–OH-группа является свободной (вариант *д*, рис. 11.13). Видно, что обе группы легко встраиваются в структуру ССИВС белков. Разнообразие типов связей в этой области создает условия для ее узнавания различными сочетаниями боковых цепей аминокислот и пептидными группами основной цепи белков. Информация, содержащаяся в пространственной структуре белка, предварительно закодированная в последовательности аминокислот в цепи, будет предопределять тип липида, с которым может взаимодействовать белок. Данный взгляд открывает возможности для проведения специальных экспериментов с целью выявления закономерностей липид-

белковых взаимодействий. Следует отметить, что между зонами ССИВС в центре модели имеется так называемая межзонная область (см. рис. 11.8), которая может быть заполнена неполярными цепями пигментов и холестерина, и стабилизирует структуру комплекса.

11.2.3.3. ***Цепи жирных кислот.*** Наша модель предполагает [3, 4, 11–13], что молекулы ФЛ ориентированы перпендикулярно плоскости мембраны и погружены в структуру белка (рис. 11.9, *в*, *г*). Данные о структуре мембранных белков показывают, что большая их часть содержит спиральные фрагменты, которые расположены также перпендикулярно плоскости мембраны [14–16]. Следовательно, жирные кислоты ФЛ могут быть в контакте со спиральными участками мембранных белков и фиксироваться последними. При этом возникает возможность пространственной согласованности между расположением двойных связей в молекуле ФЛ и структурой участвующего во взаимодействии с ФЛ спирального фрагмента белка. Таким образом, имеется перспектива для исследования и этого аспекта липид-белковых взаимодействий.

11.3. Анализ современных данных о структуре и функциях биомембран

Современное состояние исследований в области мембранологии носит противоречивый характер. С одной стороны, изучение структурных элементов биомембран, в частности, липидов, мембранных белков и мембранных комплексов уже достигло молекулярного разрешения [14–17]. С другой стороны, целостное представление о структуре биомембран пока не дошло до этого уровня, что существенно сдерживает развитие отдельных направлений мембранологии. По-видимому, не случайно в этой связи был проведен симпозиум с характерным названием «В поисках новой модели биомембран» [18]. Многочисленные идеи, высказанные на этом симпозиуме, отразили, однако, далеко не все существующие в современной литературе взгляды по этой проблеме. В частности, развиваемая в работах [11–13] зонно-блочная модель биомембран и разрабатываемые нами подходы к ее воссозданию [19–22], несмотря на их доступность англоязычному читателю, вообще не упоминалась. Отчасти это может быть связано с тем, что наша модель базируется на принципиально новых теоретических представлениях, которые требуют существенно большего охвата реальных фактов, чем это имеет место в настоящее время и поэтому трудно воспринимается узкими специалистами.

В этом разделе нами будет проведено рассмотрение наиболее существенных структурных данных, полученных при изучении биомембран. Как и в предыдущих главах, при этом нами будет использована наша программа Protein 3D, позволяющая по-новому увидеть эти результаты. Однако предварительно необходимо, хотя бы кратко, остановиться на развитии идей в области изучения структуры и функций биомембран.

11.3.1. Эволюция представлений о структуре биомембран. Одним из важных и характерных именно для биомемебран компонентов являются липиды. Естественно, поэтому, что в представлениях о структуре биомембран липиды играли и играют весьма существенную роль. Уже в 1925 году в работе [23], в результате выделения липидных компонентов из эритроцитов мембран и определения площади,

занимаемой монослоем липидов, был сделан вывод о том, что поверхность эритроцитов образована двойным слоем липидов. Дальнейшее изучение свойств липидных пленок и их взаимодействий с белками позволило Дэвсону и Даниэлли предложить одну из первых моделей структуры биомембран [24] в которой липиды были расположены в виде бислоя, гидрофобными цепями внутрь, а молекулы белков покрывали поверхность мембраны и связывались с полярными группами липидов (Рис. 11.15 *а*).

Последующее активное изучение биомембран методом электронной микроскопии показало, что большинство биомембран, если их обработать четырехокисью осмия или перманганатом калия, дают четко выраженное трехслойное строение: два наружных, электронноплотных слоя и внутренний, электроннопрозрачный. Толщина мембран составляла при этом около 7,5 нм. Основываясь на этих данных, Робертсон [25] предложил более совершенную модель биомембран (рис. 11.15, *б*), в которой белки находились в растянутой β-структурной конформации в наружных слоях мембран. При этом была сформулирована идея универсальной единичной мембраны, предполагающая, что все мембраны имеют принципиально одинаковое строение: белок-липид-липид-белок. Основным недостатком моделей [24, 25] является то, что они предполагают в основном электростатический характер связи между белками и липидами. В таком случае белки должны были бы легко отделяться от липидов в растворах с высокой ионной силой, что противоречит данным биохимии [27].

С целью разрешить противоречия моделей [24, 25] и отразить тот факт, что белки отделяются от липидов лишь органическими растворителями и детергентами, а также участь существование субъединиц в мембранах, Бенсон [27] предложил модель «липо-протеинового ковра» (Рис. 11.15 *в*). Эта модель принципиально отличается от предыдущих тем, что не предполагает наличие сплошного бимолекулярного слоя липидов. Тем не менее, полярные группы липидов в этой модели остаются ориентированными к наружи, в сторону окружающей мембраны воды. Отметим также, что модель Бенсона предполагает существование периодических блоков в мембранах, хотя она и не вскрывает природы этой периодичности.

Прогресс в исследовании биомембран методом электронной микроскопии привел к обнаружению в мембранах митохондрий и эндоплазматического ретикулума глобулярных частиц [28, 29], размером 5–10 нм, имевших гексагональную упаковку. На этом основании была сформулирована концепция субъединичного строения биомембран, нашедшая отражение в моделях [30, 31].

В зависимости от степени важности, придаваемой двум особенностям структуры биомембран — периодическому строению и наличию липидного бислоя, возникло две тенденции в развитии представлений о структуре мембран, идущих, соответственно, от моделей Робертсона [25] и Бенсона [27]. Так, в квазикристаллической модели Вандеркоои и Грина [7], основанной на результатах изучения образования комплексов между рядом белков (цитохромоксидазой, родопсином) и липидами, предполагалось, что белки взаимодействуют с липидами как полярными группировками, так и гидрофобными участками, располагаясь в мембране регулярным образом (рис. 11.15 *г*). Существование бислоя липидов в этой модели не отрицается.

Другая тенденция, игравшая доминирующее роль в минувшие тридцать лет, была сформулирована в модели Сингера и Никольсона [6]. Теоретическим основанием модели являются идеи термодинамики. По аналогии с глобулярными белками, в которых одним из определяющих факторов при формировании третичной структуры являются гидрофобные взаимодействия, авторы считают, что любая модель мембра-

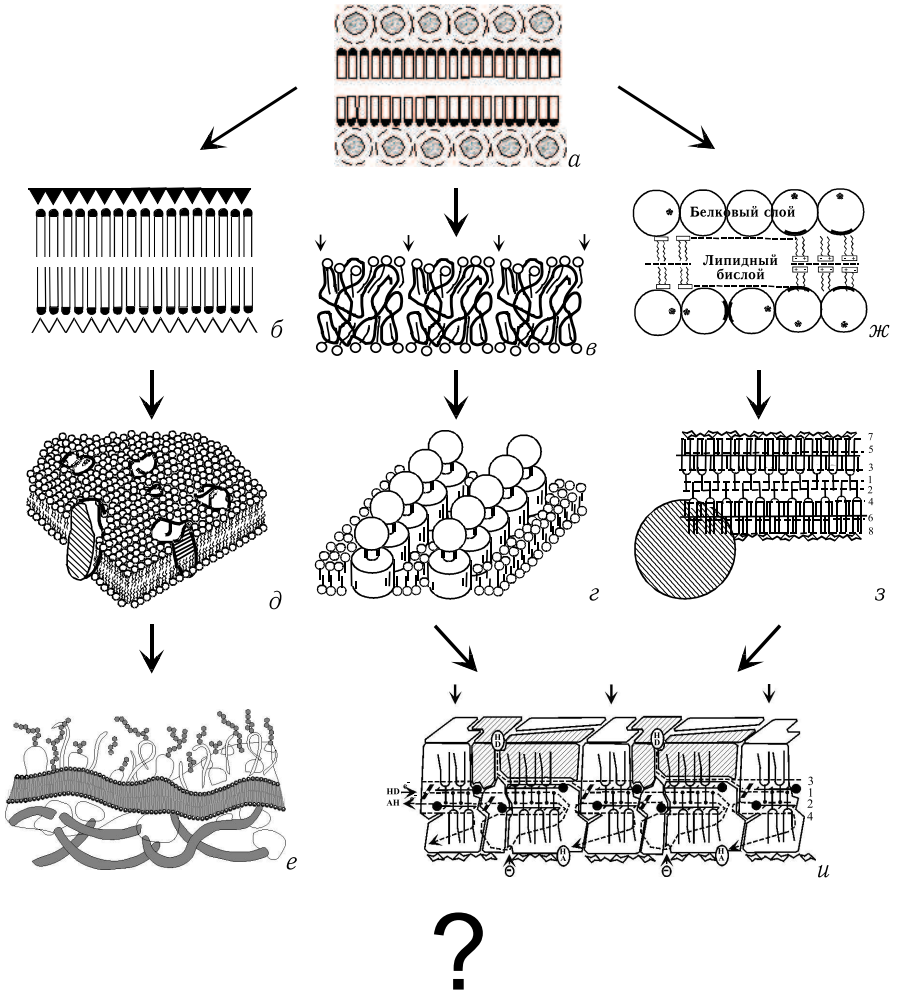


Рис. 11.15. Эволюция представлений о структуре биомембран: *а* — Danielli, Davson, 1935 [24]; *б* — Robertson, 1966 [25]; *в* — Benson, 1964 [27]; *г* — Vandercooi, Green, 1973 [7]; *д* — Singer, Nicolson, 1973 [6]; *е* — Mouritsen, Andersen, 1998 [8]; *ж* — Полтрак, 1967 [34]; *з* — Карасев, 1974 [3]; *и* — Карасев и др., 1994 [2]

ны, в которой какое-либо количество гидрофильных групп удаляется с поверхности, термодинамически невыгодна, нестабильна. Поэтому они представляют мембрану как бимолекулярный жидкий слой липидов, в котором в виде мозаики, распределены глобулярные белки (рис. 11.15 *д*). Отсюда и название модели — жидкостно-мозаичная.

Существуют ряд модификаций данной модели. В частности, в работе [32] придается важное значение существованию в структуре мембран жесткого белкового каркаса (каркасная модель), что сближает эти представления с моделью [7]. Предполагалась также упорядоченная укладка бислоя, обладающего, подобно сотам, гексагональной упаковкой ФЛ [33]. Недавний вариант модели [6] представленный

Моритсеном и Андерсеном [8], учитывает данные о роли в клетках цитоскелета и гликокаликса (рис. 11.15 *е*).

Альтернативой к рассмотренным двум тенденциям в развитии представлений о структуре мембран является третье направление, связанное с предположением об ориентации липидов полярными группами внутрь мембраны, ведущее начало от работ О. М. Полторака [34]. Им было обнаружено, что при взаимодействии с ФЛ, адсорбированными на силикагеле, мембранные ферменты значительно реактивируются. Было предположено, что полярные группы ФЛ контактируют с полярными группами силикагеля, а неполярные жирные кислоты — с белковыми глобулами. С учетом этого предположения Полторак предложил модель мембран, в которой полярные группировки липидов ориентированы внутрь структуры (рис. 11.15 *е*). При этом предполагалось, что молекулы ФЛ монослоев контактируют между собой противоположно заряженными группами (+ и −), а жирные кислоты своими цепями встраиваются в белки. Позднее было доказано, что сорбция ФЛ на силикагеле происходит именно за счет полярных групп [35].

Исходя из свойства биологических молекул образовывать непрерывные системы сопряженных ионно-водородных связей (ССИВС), одним из авторов этой книги было предложено описание гипотетического мембраноподобного комплекса, содержавшего несколько зон ССИВС [3]. Как видно на рис. 11.15 *ж*, разработанная в работе [3] зонная модель биомембран, использующая эту идею, по своей ориентации принципиально совпадает с моделью Полторака [34]. Однако она существенно дополняется представлениями о зонах ССИВС как каналах передачи энергии в биомембранах. Эта модель, как и в большинство других, предполагает существование бислоя ФЛ в структуре мембран, причем цепи жирных кислот изолированы от контакта с водой благодаря погружению в гидрофобную среду белков.

Позднее, в работе [2] эта модель была усовершенствована, путем принятия во внимание механизма переноса зарядов по ССИВС и симметрии олигомерных мембранных белков. В результате модель приобрела периодическую зонно-блочную структуру (рис. 11.15 *з*), что сблизило ее с представлениями о мембранах как двумерных кристаллах [6]. Из модели следует, что липиды в структуре мембран малоподвижны и должны иметь четкие стехиометрические соотношения с белком. Дальнейшее обсуждение этой модели проводится путем сопоставления с современными структурными данными в следующем разделе.

11.3.2. Зонная структура биомембран. В разделе 4.1.1.6 отмечалось, что несмотря на большой объем структурных данных, полученных для целого ряда мембранных ансамблей, кпд их использования относительно невелик. С помощью программы Protein 3D, используя эти данные, можно подробно рассмотреть какова структура ССИВС в этих белках. В начале седьмой главы мы привели выдержку из монографии [12], в которой предсказывалось реализация принципа континуальности ССИВС в целостных молекулярных ансамблях. В настоящее время, в связи с получением структурной информации о комплексных структурах можно убедиться в справедливости этого предсказания. Предполагалось детально рассмотреть некоторые примеры в главах 11 и 12, что и делается ниже.

В данном разделе мы покажем, на примере мембранного ансамбля цитохром С оксидазы, участвующей в процессе переноса электронов в биомембранах, как в данном

ансамбле реализуется принцип континуальности ССИВС и другие принципы нашей модели биомембран.

11.3.2.1. ***Реализация принципа континуальности ССИВС.*** Объект нашего анализа — цитохром с-оксидаза (ЦО) из митохондрий сердца быка. Изучено два несколько отличающихся состояний этой структуры (pdb файлы 1V54, 1V55, разрешение 1,8 Å и 1,9 Å соответственно [36]). Напомним что, ЦО митохондрий представляет собой комплексный димер, в каждую субъединицу которого входит, по меньшей мере, 13 отдельных полипептидных цепей (см. раздел 4.1.1.4). Наиболее важными компонентами являются цитохромы a и a_3. О компонентах ЦО трудно говорить, как о субъединицах (обычно субъединицы ферментов структурно идентичны), поскольку каждый из компонентов является частью интегрального целого.

Общая последовательность удлинения ССИВС по мере включения дополнительных компонентов. Предварительно отметим, что в структуре ЦО можно выделить несколько подсистем ССИВС. В данном разделе мы проследили лишь за теми из них, которые проходят через гемы белка A. Как мы полагаем, для процесса переноса заряда они являются наиболее важными. Анализ структуры субъединиц A, B, C, D с помощью программы Protein 3D позволил нам выявить две подсистемы, условно называемые нами подсистемами левого и правого гемов (A_1 и A_2, соответственно). Результаты этого анализа показаны на рис. 11.16, *а–д*.

Как хорошо видно на рис. 11.16, *а*, блок ССИВС, образованный левым гемом A субъединицы, содержит спиральный фрагмент, соединенный через циклическое кольцо гистидина с гемом A_1. Еще один участок сверху и сзади гема, содержит циклические боковые цепи аминокислот. Присоединение субъединицы B, расположенной частично сверху над структурой A, приводит к тому, что ССИВС гема A_1 существенно увеличивается (рис. 11.16, *б*). В отсутствие B субъединицы эти подсистемы были разъединены. Субъединица C присоединяется к комплексу ЦО слева (рис. 11.16, *в*). При этом, как видно на этом рисунке, имеет место дальнейшее продолжение подсистемы ССИВС, связанной с гемом A_1. Блок ССИВС, образованный гемом A_2, сам по себе имеет более разветвленное окружение (рис. 11.16, *г*), причем с обеих сторон гем координирован гистидинами, входящими в этот блок. Присоединение структуры D, расположенной с правой стороны комплекса, приводит к некоторому удлинению рассматриваемой подсистемы ССИВС (рис. 11.16, *д*). Следует отметить, что при некоторых условиях программа выявляет подсистемы A_1 и A_2 как взаимосвязанные. Такая возможность не исключается, однако в этой книге мы будем придерживать выбранного варианта.

Мы рассмотрели в целом, без деталей процесс удлинения подсистем ССИВС ЦО. Уже на таком уровне анализа видно, что принцип непрерывности ССИВС в этом комплексе полностью реализуется. Для большей убедительности рассмотрим подсистему ССИВС гема A_1 более детально.

Структура ССИВС, связанная с гемом A_1. Выявленные программой подсистемы ССИВС были использованы для построения более детальных схем с помощью химического редактора ChemDrow. На рис. 11.17, *а* приведена схема ССИВС, связанная с гемом A_1 в отсутствие других субъединиц.

Как видно на этой схеме, эта ССИВС своими HN–C=O-группами α-спирального фрагмента направлена снизу вверх и связана с HN–C=N-группой His 376, который координирован атомом Fe гема A_1. Кроме His 376 в эту систему входят HO–C=O-

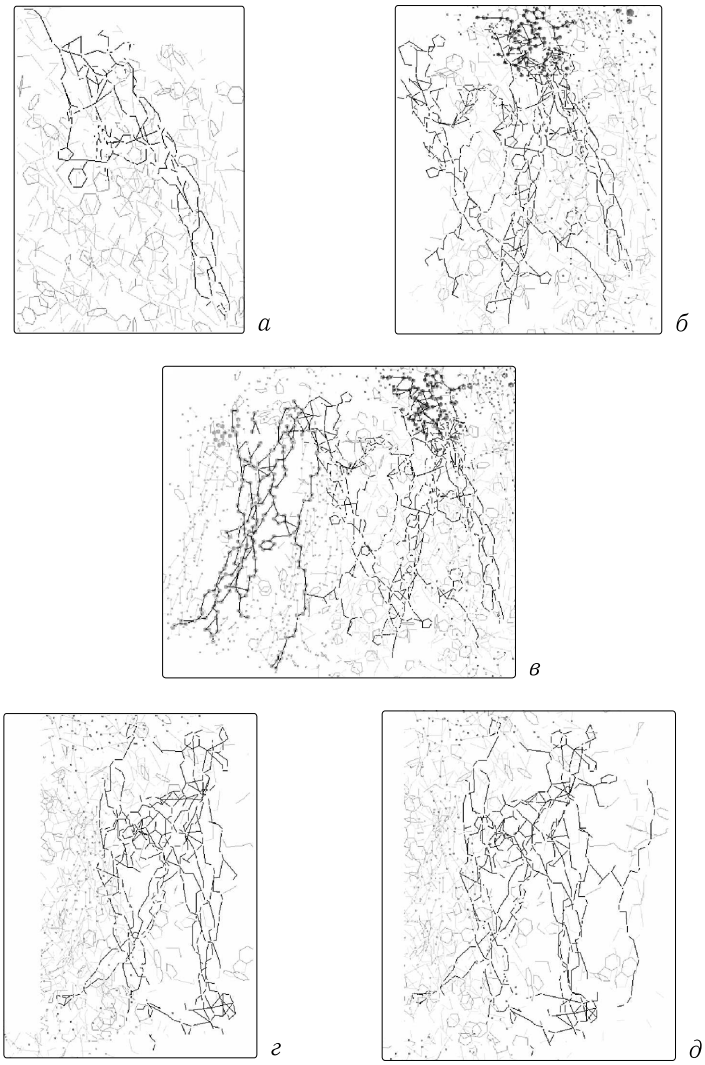


Рис. 11.16. Последовательный рост подсистем ССИВС, связанных с гемами комплекса цитохром с-оксидазы: *а* — подсистема левого гема (A_1); *б* — A_1+B субъединица; *в* — A_1+B+C субъединицы; *г* — подсистема правого гема (A_2); *д* — A2+D субъединица

и C–OH-группы неполярных остатков A и B пиролльных колец гема, а также циклические группировки Tyr 244, His 340 и His 290, составляющие верхнюю часть этой ССИВС.

Фрагменты ССИВС, выделяемые в B суъединице. В субъединице B, которую мы проанализировали отдельно, были найдены два коротких фрагмента ССИВС (рис. 11.18).

Фрагменты ССИВС A и B субъединиц образую единую систему. Совместный анализ A и B субъединиц выявил, что из A субъединицы ССИВС переходят через показанные выше фрагменты в B субъединицу (рис. 11.19). На рисунке HN–C=O-груп-

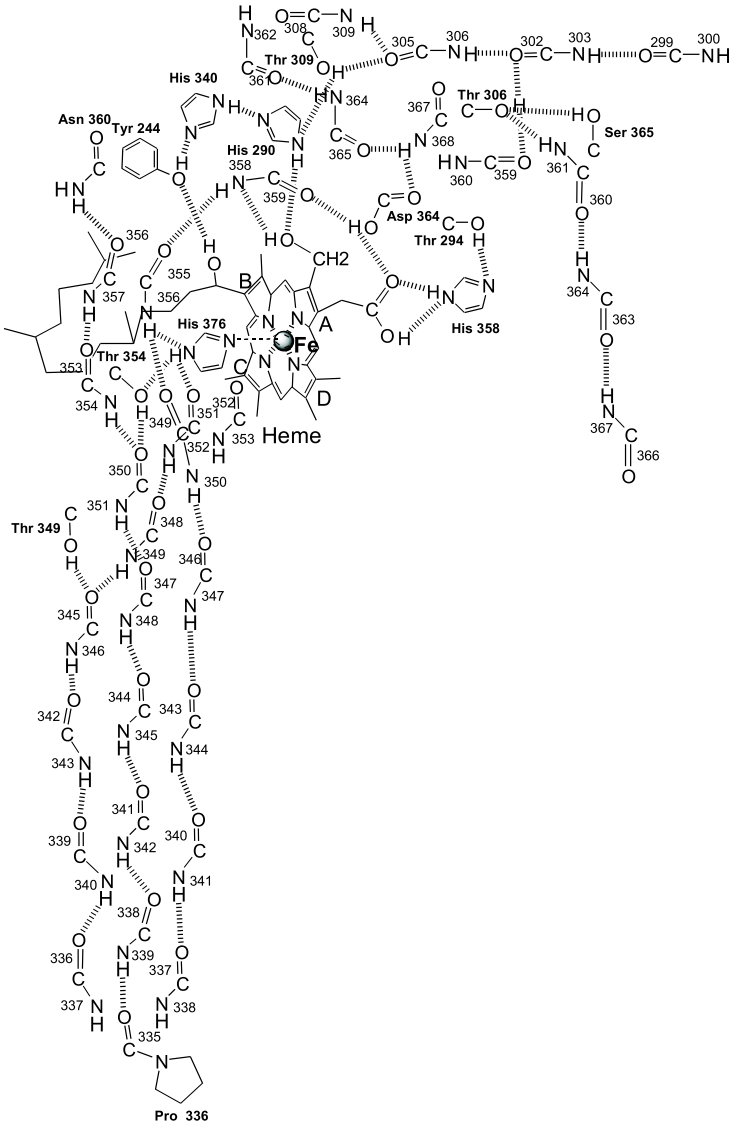


Рис. 11.17. Схема ССИВС, связанная с гемом A_1 субъединицы А

пы основной цепи белков и боковые цепи аминокислот обозначены, соответственно, индексами А и В. Выделенные ранее (рис. 11.18.) короткие фрагменты оказываются частью продолжения ССИВС, идущих из А субъединицы. Из В субъединицы они снова переходят в А субъединицу. При этом отдельные фрагменты А субъединицы, вместе с фрагментами В субъединицы образуют единое целое. Наиболее интересными особенностями этой переходной области ССИВС являются:

— наличие двух гистидинов, двух триптофанов, двух цистеинов и метионина в В субъединице;

— наличие трех тирозинов в А субъединице;

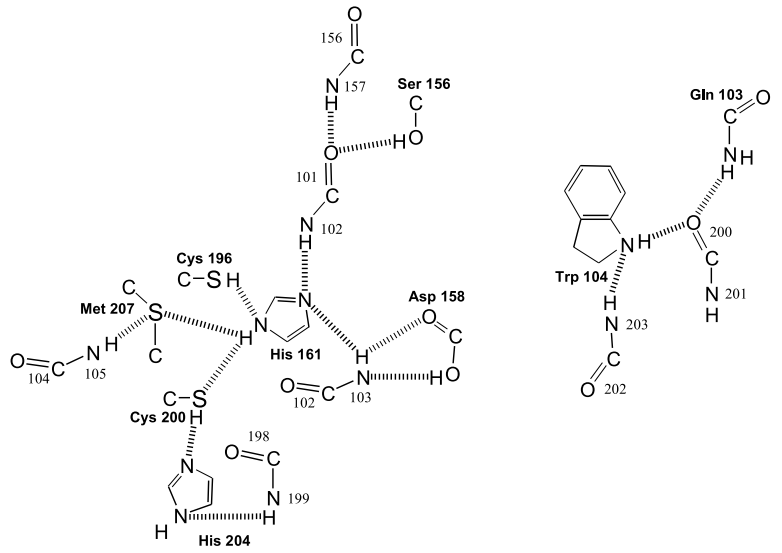


Рис. 11.18. Короткие фрагменты ССИВС, выделенные в B субъединице цитохром c-оксидазы

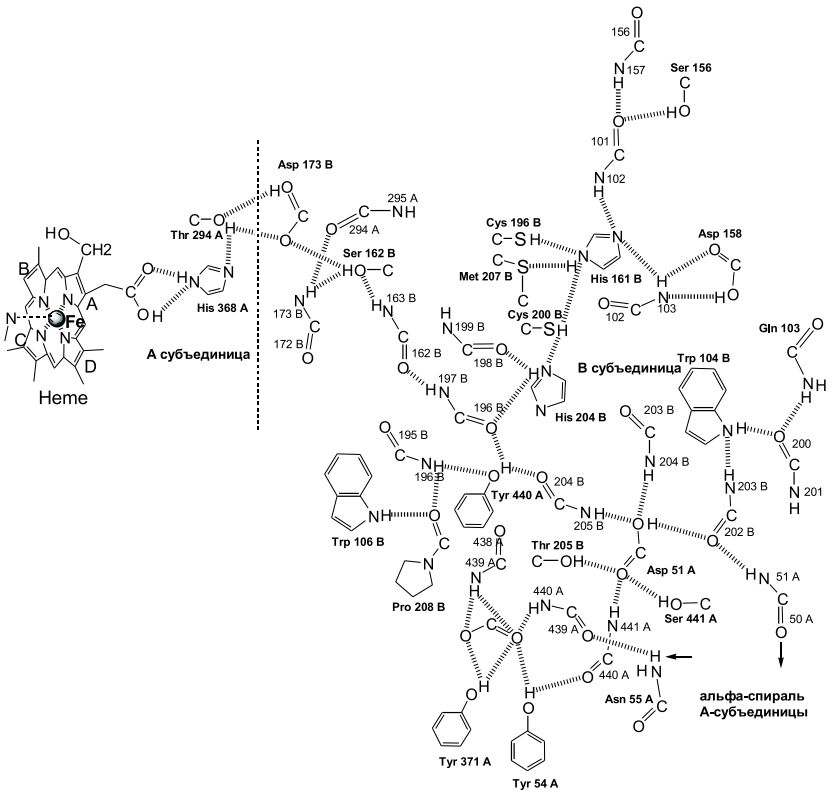


Рис. 11.19. Область контакта ССИВС A и B субъединиц цитохром c-оксидазы

— связь с α-спиралью А субъединицы (слева внизу), причем имеется лишь один вход и один выход из ССИВС (показаны стрелками).

Переход ССИВС из А субъединицы в С субъединицу. Наш анализ мы завершим рассмотрением областей контакта ССИВС А и С субъединиц. Как видно на рис. 11.20, между ними имеется две таких контактных области.

Первый контакт осуществляется между HN–C=O-группой (82, 81) α-спирали С субъединицы, которая начинается с Pro 73 (внизу рисунка) и C–OH-группо Thr 166, который входит в состав α-спирали А субъединицы. Видно, что спиральный фрагмент С субъединицы обрывается и является либо тупиковым, либо незавершенным и находит продолжение в других субъединицах.

Второй контакт находится в верхней части рис. 11.20 и осуществляется HN–C=O-группой (191, 192) α-спирали и C–OH-группой Ser 195 со стороны С субъединицы и O=C–NH-группой (224, 225) и C–OH-группой Thr 218 со стороны А субъединицы. Наиболее интересной особенностью α-спирали С субъединицы является наличие двух фрагментов ССИВС с циклическими аминокислотами. Один из них связывает две цепи ССИВС (Tyr 181, Thr 201), а другой образует триаду ССИВС (His 207, Glu 90 и Tyr 241), прикрепленную через His 207 к HN–C=O-группе (204, 203).

Как мы уже отмечали, иногда та или иная субъединица может внести свой вклад в удлинение подсистемы ССИВС лишь одной аминокислотой, связывая два разъединенных фрагмента цепи. Пример такой аминокислоты — His 36C (на рис. 11.20 он заключен в прямоугольник), принадлежащий С субъединице. Он соединяет ССИВС, содержащую два спиральных фрагмента А субъединицы. В отсутствие His 36C эти фрагменты не связаны между собой.

Наш анализ можно было бы продолжать и далее, включая последовательно все другие субъединицы. Однако уже на основании приведенного материала можно сделать вывод о том, что принцип непрерывности ССИВС полностью реализуется в таком важном комплекса, каким является ЦО. Многочисленные боковые цепи аминокислот, казалось бы, «висящие» и ни с чем не связанные, если рассматривать отдельные субъединицы сами по себе, находят свое оправдание в комплексе и включаются в ту или иную подсистему ССИВС, выполняя в ней свою молекулярную функцию.

К сожалению, пока наша программа пока не позволяет одновременно анализировать обе половины димера ЦО. Опыт анализа взаимосвязей функциональных элементов субъединиц алкогольдегидрогеназы (раздел 10.3.2.4) и F_1F_0-АТФ синтазы (раздел 10.3.3.3) показал, что такие взаимосвязи имеют важное значения для функционирования этих ферментов в целом. Аналогичные взаимосвязи существуют, вероятно, и между «мономерами» ЦО.

11.3.2.2. ***Молекулы фосфолипидов как элементы зон ССИВС биомембран.*** В разделе 6.1.4 был проведен анализ молекул ФЛ в составе ССИВС. Как показано в табл. 6.1, полярные группы этих молекул могут включаться в состав нескольких зон ССИВС (области биполярной группировки и сложноэфирных связей). В дальнейшем было показано, как эти зоны формируются согласно в зонно-блочной модели биомембран (раздел 11.2.1). Рассмотрим теперь вопрос, насколько эти представления соответствуют реальным мембранным структурам. К сожалению, хотя в работе [36] получено достаточно высокое разрешение, очистка структур привела к потере ря-

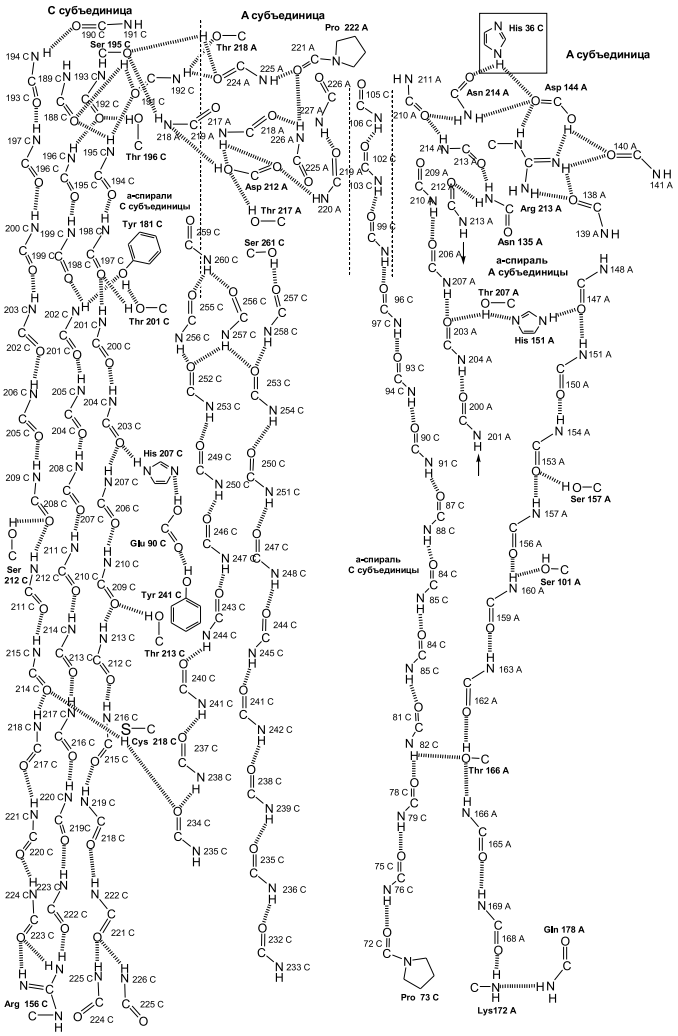


Рис. 11.20. Область контакта ССИВС А и С субъединиц цитохром с-оксидазы

да компонентов, в частности нескольких молекул ФЛ, присутствие которых было выявлено в более ранней работе [37]. Хотя степень разрешения в ней несколько меньше (порядка 2,3 Å), оно все же достаточно, чтобы предоставить достоверную информацию о характере взаимодействия молекул ФЛ со структурой ЦО. Нам известны и другие структуры, содержащие молекулы ФЛ (например, 1BCC), однако полученная для них степень разрешения существенно ниже (3,16 Å).

Итак, в структуре ЦО, выделенной из Rhodobacter sphaeroides, присутствуют три ФЛ: две молекулы диацил-ФЭА (ФЛ-1 и ФЛ-2) и одна — моноацил-ФЭА (ФЛ-3), встроенные в субъединицу *c* (рис. 11.21). Как видно на рисунке, все три молекулы ориентированы цепями жирных кислот внутрь белка, располагаясь параллельно спиральным фрагментам белка и находясь с ними в плотном контакте. В то же время, биполярные группировки, хотя и ориентированы к наружи белка, погружены

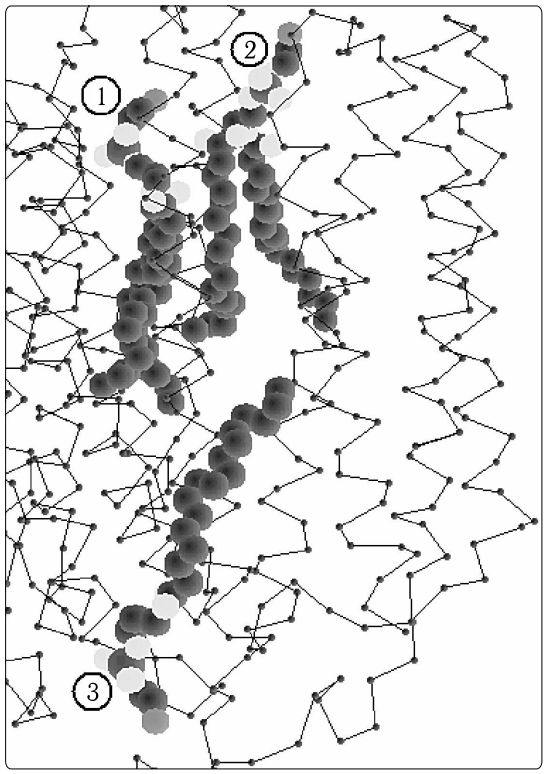


Рис. 11.21. Локализация молекул фосфолипидов в структуре цитохром-с-оксидазы (по [37], файл 1M56): *1*, *2* — молекулы диацил-ФЭА (ФЛ-1 и ФЛ-2); *3* — молекула моноацил-ФЭА (ФЛ-3)

в белковую структуру и встраиваются в ССИВС белков. Подробно мы покажем эти взаимодействия на примере молекулы ФЛ-2. Характер встраивания остальных ФЛ, если не считать большей сложности ССИВС, аналогичен.

Область амино- и фосфатной групп. Как видно на рис. 11.22, *а*, фосфоэтаноламиновый остаток ФЛ-2 (показан в прямоугольнике) встраивается в ССИВС только фосфатной группой. Атом кислорода этой группы, обозначенный как O_{13}, связан с протяженной а-спиралью (три системы HN-C=O-групп), к которой присоединен Tyr 33. Другой атом кислорода, обозначенный как O_{14}, с одной стороны через Arg 131 и Glu 65 связан фрагментом альфа-спирали, а с другой стороны — с Trp 68. Аминогруппа, как видно на рис. 11–22, остается свободной. Отметим, что свободна и аминогруппа в моноацил-ФЭА. В то же время, эта группа в диацил-ФЭА-1, как выявляет наша программа, через пептидную группу O=C–NH (231,232) B-субъединицы связывается с N–C=N-группами Arg 161 C, которые включаются в протяженные системы ССИВС, образованные α-спиралью C субъединицы. К этим системам через свои C=C–OH-группы присоединены, в частности, Tyr 186C и Tyr 246C.

Область сложноэфирных связей. Взаимодействия в этой области в двух молекулах ФЛ показаны на рисунках 11.23, а, *б* и 11.24, а, *б*.



Рис. 11.22. Встраивание фосфатной группы ФЛ-2 в структуру ССИВС цитохром-с-оксидазы (по [37], файл 1M56): *а* —рисунок, полученный программой Protein 3D; *б* — схема ССИВС

Как следует из рис. 11.23, в молекуле ФЛ-1 со сложноэфирными связями взаимодействует Arg 226 C. Одновременно эта молекула образует водородные связи с HO–P=O-группой ФЛ-1. Таким образом ССИВС, в которых участвует HO–P=O-группа этого ФЛ, заканчивается O–C=O-группой жирной кислоты, занимающей α-положение в диглицеридном остатке.

В молекуле ФЛ-2, как видно на рисунках 11.24, *а*, *б*, с O–C=O-группой жирной кислоты, также занимающей α-положение, связывается боковая цепь Trp 69C. С O–C=O-группой второй жирной кислоты (β-положение) контактирует протяженный фрагмент α-спирали C субъединицы. Отметим, что, как видно на рисунке, O–P=O-группа ФЛ-2 также контактирует с триптофаном (Trp 69 C), который может выступать в качестве элемента инверсии связанных с этой группой ССИВС (см. рис. 11.22, *а*, *б*). Что касается молекулы ФЛ-3, то с ней в области O–C=O-группы контактирует Trp 99 C и в этом смысле она аналогична молекуле ФЛ-2. Отметим также, что одна из молекул ФЛ, найденных в структуре 1BCC, в этой области, по-видимому, взаимодействует с Trp 31, а также Tyr 105. Таким образом, терминирующие циклические аминокислоты, вероятно, является типичными в ФЛ-белковом взаимодействии в этой области.

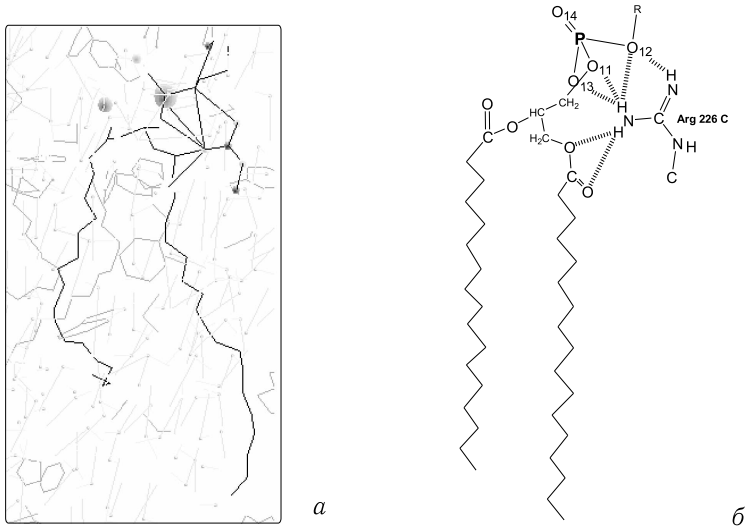


Рис. 11.23. Область сложноэфирных связей молекулы ФЛ-1 в составе ССИВС цитохром-с-оксидазы (по [38], файл 1M56): *а* — рисунок, полученный программой Protein 3D; *б* — схема ССИВС

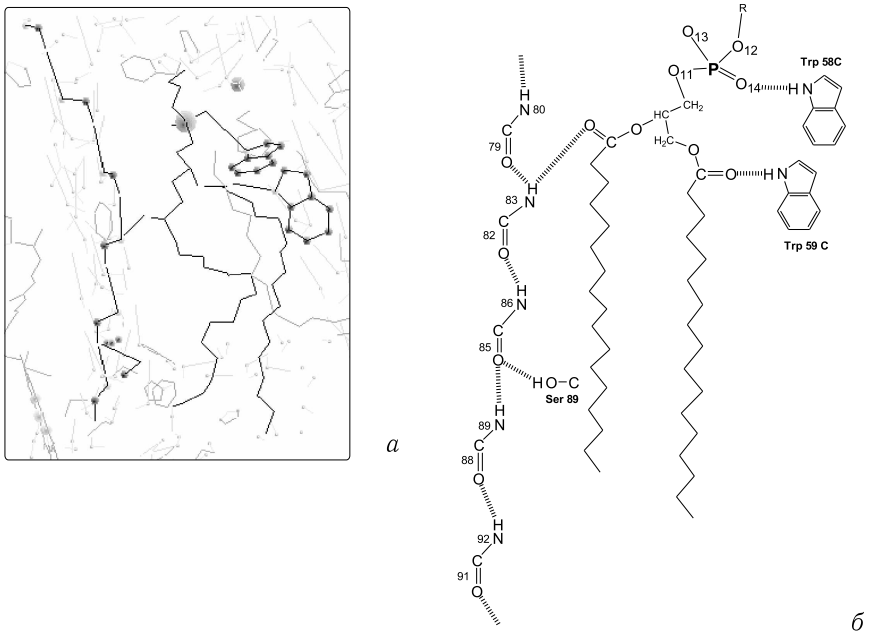


Рис. 11.24. Область сложноэфирных связей молекулы ФЛ-2 в составе ССИВС цитохром-с-оксидазы (по [38], файл 1M56): *а* — рисунок, полученный программой Protein 3D; *б* — схема ССИВС

Что касается контактов цепей жирных кислот, то, как мы видели (рис. 11.21.), они окружены α-спиральными фрагментами белков, которые и определяют характер их взаимодействия. В основном это ван-дер-ваальсовы контакты с основной цепью и боковыми цепями неполярных аминокислот, что также отражено в нашей модели биомембран (ср. с рис. 11.9, *в*, *г*).

Таким образом, современные структурные данные о характере липид-белковых взаимодействий в биомембранах вполне поддаются интерпретации с позиции концепции ССИВС и зонно-блочной модели мембранных структур. Наибольшую значимость в составе ССИВС играют HO–P=O-, а также амино-группы биполяных головок ФЛ. В то же время, область связи жирных кислот ФЛ играет скорее структурную роль и участвует в дополнительной связи ФЛ с белком. На это указывает также и отсутствие входов в O–C=O-группах ФЛ.

Следует отметить, что пока не найдено взаимодействия двух биполярных группировок по типу, показанному на рис. 11.10. При этом жирные кислоты ориентированы не к наружи, а внутрь структуры. Таким образом экспериментальные данные пока не подтверждают оринтации ФЛ, предложенной в моделях [2, 3, 34]. На это можно сказать следующее. Во-первых, исследование ФЛ-белковых комплексов только начинается и многое еще впереди. Во-вторых, принципиальным в нашей модели является сам характер участия биполярных групп в составе ССИВС (по типу рис. 11.9 *в, г*), что подтвердилось, а конкретные структуры и варианты ориентации липидов в них могут быть достаточно разнообразны. Наконец, в третьих, нами получены довольно сложные модельные структуры (комплексы аналога ФХ с холестерином, см. раздел 11.4.5), в которых такие взаимодействия воссоздаются. Этот факт указывает на возможность таких взаимодействий и в биомембранах.

Следует отметить, что последние данные о липид-белковых взаимодействиях обсуждаются в недавнем обзоре [38], а также в работе [39]. В обзоре [38] приведена таблица всех изученных к настоящему времени методом РСА белковых структур, содержащих в своем составе липиды, в том числе и ФЛ. Хотя и этот обзор, и оригинальная статья [39] являются прекрасными сводками современных данных, в отсутствие представлений о ССИВС так и остается мало понятным, в чем состоит функциональная роль ФЛ в мембранных комплексах.

11.3.3. Блочная двумерная организация биомембран. Наша задача в этом разделе существенно упрощается в связи с тем, что двумерная организация мембранных структур уже была в общих чертах рассмотрена в разделе 3.2.3.2. Наиболее информативным и достоверным подходом в изучении двумерной топографии мембранных структур, как мы упоминали, оказался метод электронной криомикроскопии, с последующим Фурье-синтезом, что позволило осуществлять трехмерную реконструкцию белков в составе мембран с достаточно высоким разрешением (от 10-12 А до 3,5 А). Одной из первых работ, осуществленных с помощью этого метода, явилось изучение структуры бактериородопсина (тримера, имеющего симметрию C_3), локализованного в нативных мембранах пурпурных бактерий Halobacterium halobium [40, 41]. Разрешение структуры бактериородопсина, полученное этим методом, достигло 3,5 А [42]. Типичная картинка, полученная авторами, вошла во многие монографии (см., например, в [43], рис. 59). На этом рисунке видно, что бактериородопсин — тример, образующий в мембране двумерную решетку.

В настоящее время исследование структуры нативных мембран сочетается с изучением двумерных кристаллов, реконструируемых из мембранных белков и липидов, как выделенных как из тех же мембран, так и другого типа. Таким методом исследованы многие структуры, перечисленные в в разделе 3.2.3.2. В качестве примера приведем двумерную структуру высокоспецифичного порина FhuA, выделенного из E. coli, воссозданную этим методом (рис. 11.25 *а*, *б* [44]).

На рисунках хорошо видна симметрия C_2, характерная для укладки этого белка, и варианты его укладки в виде двумерного кристалла. Подробный анализ этого метода и полученных результатов приведен в ряде обзоров [44–46].

С использованием данного метода получены также и двумерные кристаллы цитохромоксидазы (представляющей собой, как мы видели, димерный комплекс, состоящий из большого числа индивидуальных белков), выделенной из разных микроорганизмов, в частности, рассмотренного выше Rhodobacter sphaeroides [47]. Таким образом, принцип блочной организации, сформулированный в общей модели

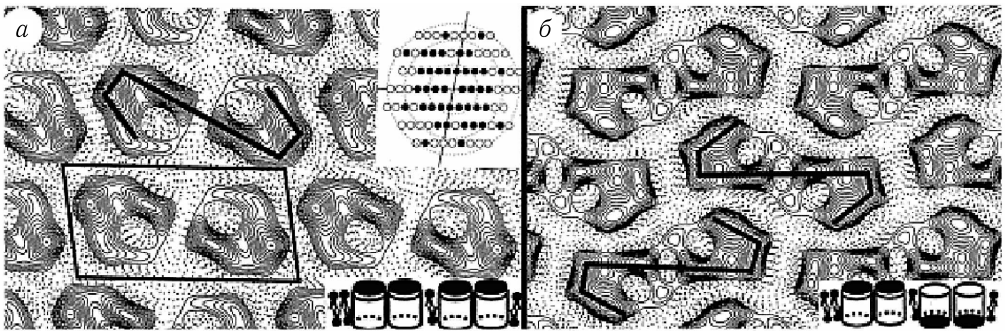


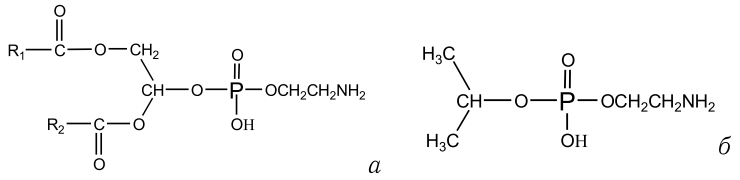
Рис. 11.25. Варианты укладки порина FhuA в реконструированной двумерной структуре (по работе [44]): *а* — однообразная укладка; *б* — попеременная укладка (схемы укладки показаны справа внизу)

мембран (см. раздел 11.1.2), находит реальное воплощение в структуре биомембран, исследуемых современными щадящими методами крио-микроскопии.

11.4. Физическая реконструкция зонно-блочной модели биомембран

11.4.1. Предпосылки к реконструкции зонно-блочной модели биомембран. Предложенная нами в разделе 11.2 зонно-блочная модель биомембран, по крайней мере, отдельные ее фрагменты, могут быть воссозданы и изучены с помощью экспериментальных подходов. Логика «физической реконструкции зонно-блочной модели биомембран» была изложены в работе [13], открывшей серию статей с одноименным общим заголовком. Как видно на рис. 11.10 и 11.11, принципиально важным для данной модели является ориентация биполярных группировок внутрь структуры мембран с образованием двойных зон ССИВС, состоящих из чередующихся C-NH_2 и HO–P=O-групп ФЭА (рис. 11.10) или зон из ионных групп (C–$N^+(CH_3)_3$ и $^-$O–P=O, рис. 11.11). Очевидно, что подобные зоны могут не только возникать в кристаллах молекул фосфолипидов (см., например, обзор [48]), но и могут быть

специально воссозданы с помощью их аналогов. Мы использовали для этих целей изобутильные аналоги ФЭА и ФХ. Рассмотрим, в качестве примера ФЭА (схема 11.1, *а*) и его аналог изобутил-2-аминоэтилфосфат (ИФЭА — схема 11.1, *б*):



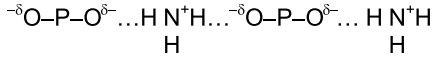
а *б* (11.1)

Как видно на схеме, изобутильный остаток в значительной степени сохраняет ту часть структуры ФЭА, которая соответствует глицериновому остатку ФЭА. В то же время, цельной молекуле фосфолипида свойственны такие недостатки как наличие длинных углеводородных цепей, мешающих воссозданию зон ССИВС, и сложноэфирных группировок, способных к образованию водородных связей с аминогруппами, тогда как ИФЭА лишен этих недостатков.

Синтез ИФЭА проводили как путем поэтапного присоединения защищенных групп [13], по аналогии с синтезом гексадецил-ФЭА [49], так и через образование циклических промежуточных продуктов — оксазафосфоланов [21, 50], впервые описанных в работе [51]. Изобутильный аналог ФХ (изобутил-2-(триметиламмонио) этилфосфат — ИФХ) синтезировали через образование циклических диоксофосфоланов [20], по методу [52]. Полученные соединения легко кристаллизуются. Выбранные для РСА монокристаллы использовали для исследования из кристаллической и молекулярной структуры. Кристаллы ИФЭА исследовали непосредственно, а кристаллы ИФХ, а также ИФЭА-гидрохлорида и ИФЭА-гидробромида, ввиду их сильной гигроскопичности, для изучения помещали в стеклянные капилляры. Эксперимент осуществляли на четырехкружном автоматическом дифрактометре Syntex $P2_1$ при комнатной температуре. Съемку проводили ω-методом в MoK_α-излучении. Дальнейшие методические подробности можно найти в оригинальных работах [13, 20, 21].

11.4.2.1. ***Структура кристаллов ИФЭА.*** Основные физические свойства и параметры кристаллов ИФЭА приведены в табл. 11.1. (по данным работы [13]. Как и ожидалось, в структуре кристаллов ИФЭА молекулы этого соединения ориентированы таким образом, что аминогруппа одной молекулы, находящаяся в ионизированном состоянии ($C–N^+H_3$) образует водородную связь с фосфатной группой ($^-O–P=O$) соседней молекулы ИФЭА [13]. Таким образом, основу кристалла составляют пары молекул ИФЭА (рис. 11.26).

В результате в кристалле образуются протяженные системы ионно-водородных связей типа (схема 11.2):



(11.2)

При внешнем сходстве с ССИВС, такие системы имеют одно существенное отличие: водородные связи аминогрупп в них симметричны. Очевидно, что это не соответствует требованиям модели переноса зарядов (см. раздел 5.2), и кристаллы чистого ИФЭА не представляют интереса для моделирования этого процесса в мембранах. Отметим, что по нашим данным (не опубликованным) кристаллы ИФЭ являются чистыми диэлектриками.

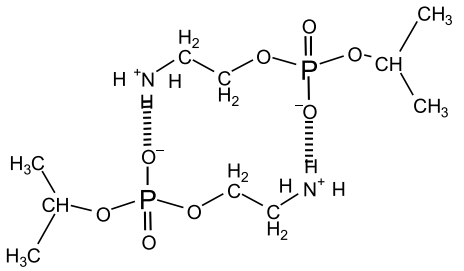


Рис. 11.26. Схема расположения пар молекул изобутил-2-аминоэтилфосфата в кристалле (по данным работы [13])

11.4.2.2. ***Структура кристаллов ИФЭА-гидрохлорида и ИФЭА-гидробромида.*** Поскольку нашей задачей было получение ССИВС, содержащих чередующиеся амино и фосфатные группы, то возникла проблема, как их получить. В кристаллах ИФЭА эти группы находятся в ионизированном виде (константы ионизации pK, по нашим данным [19], составляют 9,47 для амино- и 3, 39 для фосфатной группы). Способом получения ассоциированных с протонами HO–P=O-групп является создание их избытка в растворе, которое можно создать путем титрования раствора ИФЭА какой-либо кислотой. Мы использовали для этих целей HCl и HBr. Методы получения галогенпроизводных ИФЭА описаны нами в работах [19, 21]. Полученные в результате кристаллы ИФЭА-HCl и ИФЭА-HBr существенно отличались по свойствам от кристаллов исходного ИФЭА. Они обладали гигроскопичностью, имели фруктовый запах и легко плавились (см. табл. 11.1). Структуру полученных кристаллов изучали методом РСА. Основные физические свойства и параметры элементарной ячейки приведены в табл. 11.1, из которой следует, что структуры ИФЭА-HCl и ИФЭА-HBr изоморфны. Координаты атомов кристалла ИФЭА-HCl приведены в работе [19], а основные геометрические характеристики — в работе [21]. Как следует из таблицы, элементарная ячейка ИФЭА-HCl содержит 16 молекул. Следует отметить, что в структуре было найдено два типа кристаллографически независимых молекул ИФЭА, которые были обозначены нами как A и A'.

На рис. 11.27 приведены проекции элементарной ячейки ИФЭА-HCl (для облегчения восприятия показана половина элементарной ячейки) на плоскости ac (рис. 11.27, *а*) и bc (рис. 11.27, *б*). Из рис. 11.27, *а* видно, что молекулы ИФЭА представлены двумя типами: молекулы ИФЭА, которые связаны с атомами Cl^1, обозначены как молекулы типа A (все атомы без штрихов), а молекулы ИФЭА, которые связаны с атомами $Cl^{1\prime}$ — как молекулы типа A′ (атомы обозначены со штрихами). В этом кристалле все молекулы ИФЭА образуют бислой, в котором аминогруппы ориентированы внутрь и формируют зоны систем водородных связей с участием атомов хлора. В то же время, как показано на рис. 11.27, *б*, фосфатные группы, расположенные по обе стороны от центральной зоны, также образуют зоны водородных связей, состоящие из HO–P=O-групп, (схема 11.3):

$$\text{HO–P=O}\ldots\text{HO–P=O}\ldots\text{HO–P=O}\ldots\text{HO–P=O} \qquad (11.3)$$

Эти системы, содержащие асимметрично расположенные атомы водорода и являющиеся, очевидно, частным случаем ССИВС, идут через весь кристалл, попеременно меняя направление. Таким образом, хотя ССИВС, состоящие из чередующихся

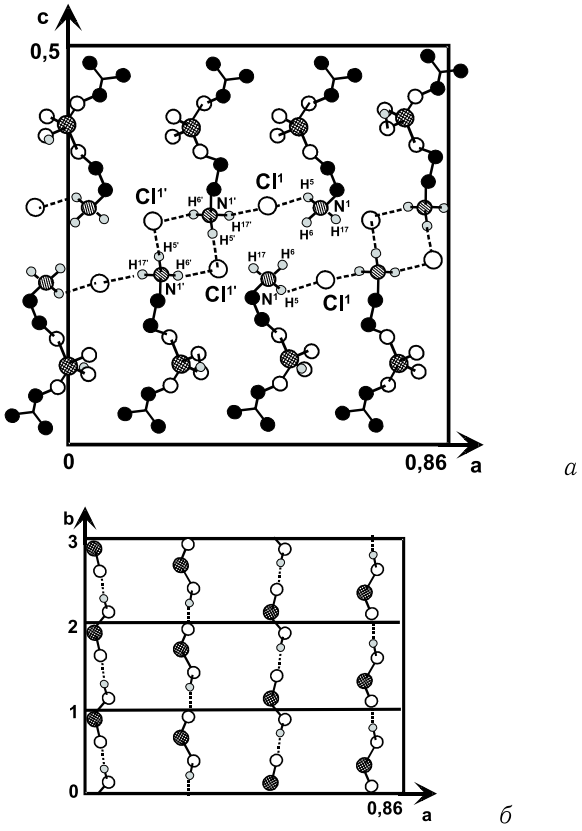
Таблица 11.1

Физические свойства и кристаллографические параметры кристаллов изобутил-2-аминоэтилфосфата гидрохлорида (ИФЭА-HCl) изобутил-2-аминоэтилфосфата гидробромида (ИФЭА-HBr) и изобутил-2-аминоэтилфосфата (ИФЭА)

	ИФЭА-HCl	ИФЭА-HBr	ИФЭА
Молекулярная формула	$C_8H_{17}NO_4PCl$	$C_8H_{17}NO_4PBr$	$C_8H_{16}NO_4P$
Формульный вес	233,67	287,08	197,17
$T_{пл.}$	89 °C	99 °C	246 °C
Состояние на воздухе	Гигроскоп.	Гигроскоп.	Сухие
Расворимы	Вода, этанол, метанол	Вода, этанол, метанол	Вода, этанол, метанол
Нерастворимы	Ацетон, гексан	Ацетон, гексан	Хлороформ, ацетон, CCl_4, гексан
Плотность$_{выч.}$ ($г \cdot см^{-3}$)	1,33	1.55	1,28
Кристаллографическая система	моноклинная	моноклинная	моноклинная
Пространственная группа	C2/c	C2/c	C2/c
a (Å)	21,892(8)	22,115(14)	7, 63(1)
b (Å)	4,7747(2)	4,808(3)	9,24(1)
c (Å)	44,63(2)	44,83(2)	32,33(6)
β (град.)	91,83(3)	91,74(5)	89,4(1)
V($Å^3$)	4,663	4,766	2,280
Z	16	16	8
Количество использованных рефлексов	1766	—	1620
R (R_w)	0,049(0,055)	—	0,063(0,068)

амино- и фосфатных групп, в кристалле ИФЭА-HCl не были получены, тем не менее, системы из HO–P=O-групп представили интерес как модель для изучения свойств ССИВС. По сути, нами впервые был получен искусственный аналог биосреды, имеющий перспективы для дальнейшего изучения и использования. Несколько ниже приведены результаты этой работы (разделы 11.4.3 и 11.4.4).

11.4.2.3. ***Структура кристаллов ИФХ моногидрата.*** Исследование структуры кристаллов ИФХ было начато несколько позже в связи с трудностями получения как самого соединения, так и подбора условий выращивания кристаллов. Синтез был осуществлен через образование промежуточных циклических соединений — диоксофосфоланов, по методу, описанному в работе [52]. Для выращивания монокристаллов



а

б

Рис. 11.27. Проекция элементарной ячейки кристалла ИФЭА-гидрохлорида: *а* — на плоскость ac; *б* — на плоскость bc. Приведена половина элементарной ячейки

было испытано три растворителя: вода, диметилформамид (ДМФА) и изобутанол с добавлением 0,5 % воды [20]. Как выяснилось, два продукта кристаллизации — из воды и ДМФА оказались идентичными и представляли собой ИФХ моногидрат. В то же время, из изобутанола были выращены кристаллы, содержащие кроме воды, также изобутанол. Данные, полученные в результате РСА всех трех кристаллов приведены в табл. 11.2.

В этом разделе будет рассмотрена структура кристаллов ИФХ моногидрата. Проекции элементарной ячейки на плоскости ac и ab приведены в работе [20]. Мы ограничимся лишь схемой расположения молекул ИФХ в кристалле, что не меняет, в принципе, сути полученных результатов (рис. 11.28.). Как видно на приведенной схеме, молекулы ИФХ соединяются между собой в цепи (ближняя цепь молекул ИФХ выделена жирным шрифтом) за счет водородных связей между фосфатными группами и молекулами воды (схема 11.4):

$$^{-\delta}O–P–O^{-\delta}\ldots H–O–H\ldots{}^{-\delta}O–P–O^{-\delta}\ldots H–O–H\ldots{}^{-\delta}O–P–O^{-\delta}\ldots H–O–H\ldots \qquad (11.4)$$

Существенно подчеркнуть, что цепи содержат симметричные водородные связи, а не ССИВС. В свою очередь, эти цепи за счет ионных связей между $^{-\delta}O–P–O^{-\delta}$

Таблица 11.2

Кристаллографические данные по структуре кристаллов ИФХ моногидрата (ИФХ·H_2O) и комплекса ИФХ моногидрата с изобутанолом (ИФХ·H_2O·ИБ)

Параметр	ИФХ·$H_2O_{вода}$	ИФХ·$H_2O_{ДМФА}$	ИФХ·H_2O·ИБ
Мол.формула	$C_9H_{25}NO_4P·H_2O$	$C_9H_{25}NO_4P·H_2O$	$C_9H_{25}NO_4P·H_2O·C_4H_{10}O$
Мол.масса	260,290	260,290	334,412
Пр.группа	$P2_1/a$	$P2_1/a$	$P2_1/a$
a (Å)	11,076(3)	11,075(4)	11,370(6)
b (Å)	9,688(3)	9,679(3)	9,397(5)
c (Å)	13,927(3)	13,921(5)	18,12(1)
β (град.)	110,57(2)	110,63(4)	99,42(5)
V(Å^3)	1399(1)	1397(2)	1910(30
$D_{выч.}$ г · см$^{-3}$	1,224(1)	1,224(2)	1,111(2)
Z	4	4	4
Количество рефлексов	–	1792	1274
R (F)	–	0,054	0,062

и $N^+(CH_3)_3$-группировками противолежащих и развернутых на 180° молекул ИФХ укладываются в слои. Другая система ионных связей (не показана), также между $^{-\delta}O–P–O^{-\delta}$ и $N^+(CH_3)_3$-группировками организует эти слои в бислой, причем эти связи образуются между парами молекул, расположенных в соседних слоях и развернутых относительно друг друга на 180°. Таким образом, как и в случае с ИЭФА, в кристаллах ИФХ наблюдается образование пар молекул изобутильных аналогов ФЛ, но скрепленных не за счет водородных, а за счет ионных связей противоположно заряженных группировок. Отметим, что близкая по структуре укладка фосфохолиновых группировок наблюдается также и в структуре кристаллов фосфатидилхолина (2-дезокси-3-лауроил-глицеро-ФХ моногидрата) [53] и это несмотря на то, что последний содержит существенно больший по размерам диглицеридный остаток. Этот факт указывает на консервативный характер укладки биполярных группировок ФЛ.

11.4.2.4. ***Структура комплекса ИФХ моногидрата с изобутанолом.*** Как было упомянуто выше, нами были получены также кристаллы ИФХ из изобутанола (ИБ) с добавлением 0,5 % воды [20]. Полученные кристаллы ИФХ ·H_2O· ИБ, несмотря их низкую стабильность на воздухе, были изучены (в капиллярах) методом РСА. Параметры элементарной ячейки этих кристаллов приведены в табл. 11.2. Как видно из сравнения с другими кристаллами ИФХ, они существенно отличаются в направлении оси c. Расшифровка структуры этих кристаллов позволила установить, что укладка молекул ИФХ в этих кристаллах блика к таковой в структуре ИФХ ·H_2O. В то же время, как показано на рис. 11.7, молекулы изобутанола оказались расположенными в промежутках между изобутильными остатками ИФХ, прикрепляясь с помощью водородных связей к атомам кислорода молекул HOH, формирующих цепь водородных связей с O–P=O-группами ИФХ. Следует отметить, что использование

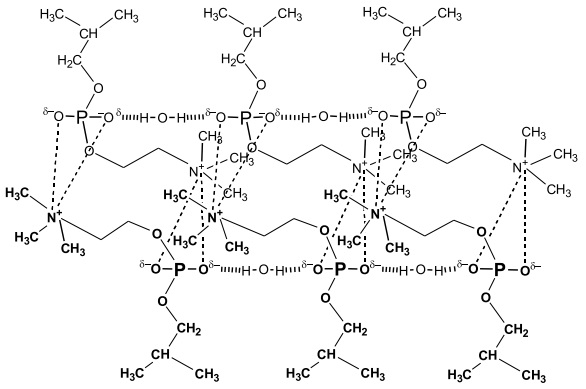


Рис. 11.28. Схема расположения молекул ИФХ в кристалле ИФХ моногидрата (по данным работы [20])

изобутанола в качестве растворителя оказалось очень перспективным и позволило получить еще один комплекс ИФХ — с холестерином, структура которого будет рассмотрена ниже.

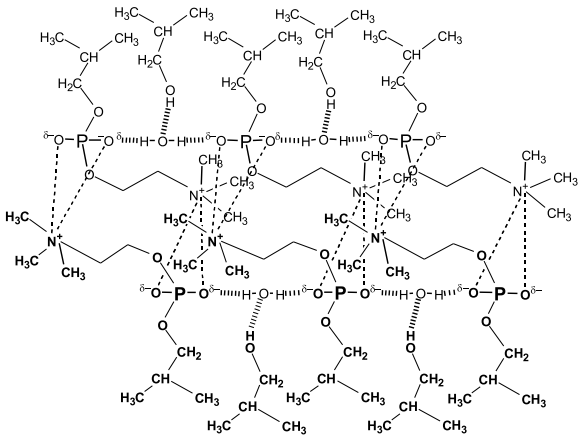


Рис. 11.29. Схема расположения молекул ИФХ в комплексном кристалле ИФХ $\cdot H_2O\cdot$ изобутанол (по данным работы [20])

11.4.3. Изучение электрофизических свойств модельных кристаллов. Среди разнообразных методов, которые можно было бы применить к изучению физических свойств кристаллов аналогов ФЛ, мы выбрали электрофизические исследования. Однако, для кристаллов чистого ИФЭА, хотя он и устойчив на воздухе, нам не удалось получить стабильный контакт с измерительными электродами. Полученные результаты, хотя и указывали на то, что это соединение — диэлектрик, имели сильный разброс по величине. Изобутильный аналог ФХ (ИФХ моногидрат) также был неудобен для этих целей вследствие его влагочувствительности. Для изучения электрофизических свойств нами были, в основном, использованы галогенгидридные аналоги ИФЭА (ИФЭА-HCl и ИФЭА-HBr) [19, 21]. С одной стороны, низкая температура плавления кристаллов позволила легко получать из них материал, хорошо

контактирующий с электродами, благодаря чему на этих производных были получены достоверные электрофизические измерения. С другой стороны, информацию о свойствах кристаллов оказалось возможным интерпретировать с учетом данных об их структуре.

11.4.3.1. ***Методика приготовления образцов.*** Данная методика была разработана нами исходя из свойств образцов [19, 21]. Кристаллы вещества расплавляли в термостате, и каплю расплава наносили микропипеткой на нагретый в том же термостате титановый электрод диаметром 6 мм. На этот же электрод накладывали диэлектрическую прокладку их тефлона толщиной 50 мкм и внутренним отверстием 5 мм и сверху накрывали вторым нагретым электродом. При сдавливании электродов избыток расплавленного гелогенпроизводного ИФЭА удаляли и после остывания получали «сэндвич» с фиксированным расстоянием между электродами. Такой метод приготовления образцов одновременно обеспечивал изоляцию материала от окружающей атмосферы (напомним, что эти производные обладали влагочувствительными свойствами). Перед началом измерений приготовленные образцы хранили в эксикаторе над щелочью. Изучение вскрытых сэндвичей под микроскопом в скрещенных николях выявило, что аналоги кристаллизуются на электродах в виде поликристаллов, имевших преимущественно одинаковое направление. Следует отметить, что нами предпринимались попытки электрофизичекизх измерений монокристаллов ИФЭА-HCl и ИФЭАНBr, однако они оказались неудачными вследствие гигроскопичности этих соединений.

11.4.3.2. ***Метод измерения электрофизических параметров.*** Измерение параметров — проводимости (G) и емкости (C) производили мостовым методом [54] на мостах полных проводмостей МПП-10, емкостей У8-2 и измерителя импеданса ВМ-%)? (Tesla). Данная методика позволяет раздельно и одновременно измерять C и G вещества исходя из параллельной эквивалентной электрической схемы замещения исследуемого образца. Готовые образцы помещали в измерительную ячейку. Измерения проводили в переменном токе. Диапазон измеряемых частот — 50 Гц–10 МГц, пределы задаваемых температур — от 20 до +70 °C. Замер температур осуществляли с помощью термопары, встроенной в измерительную ячейку. Измерения параметров образцов проводили при слабых сигналах (до 1 мВ), что обеспечивало их сохранность. При высоких напряжениях ($U \approx 1$В) и при постоянном токе происходили необратимые изменения электрических параметров галогенгидридных производных ИФЭА.

Значения составляющих комплексной диэлектрической проницаемости ε', ε'' и удельной проводимости γ рассчитывали из результатов измерения согласно следующим выражениям (11.5)–(11.7):

$$\varepsilon' = C \cdot \frac{l}{S \cdot \varepsilon_0}, \tag{11.5}$$

где l — толщина образца; S — площадь; ε_0 — $8{,}85 \cdot 10^{-12}$ Ф/м — диэлектрическая постоянная;

$$\varepsilon'' = \gamma \cdot \frac{l}{S \cdot \varepsilon_0 \cdot \omega}, \tag{11.6}$$

где $\omega = 2\pi f$ — круговая частота;

$$\gamma = G\,\frac{l}{S}. \tag{11.7}$$

11.4.3.3. ***Результаты измерений и их обсуждение.*** Измерения поликристаллических образцов в диапазоне 50 Гц–10 МГц показали сильную частотную зависимость. На рисунках 11.30 и 11.31 показана частотная зависимость комплексной диэлектрической проницаемости ε' и ε'' при нескольких температурах для образцов ИФЭА-HCl и ИФЭА-HBr. Эта зависимость, как видно на рисунках, является сходной для обоих образцов: ε' монотонно уменьшается с увеличением частоты, в то время как ε'' проявляет релаксационный максимум. При высоких частотах ε' приближается к значениям 10–20. С повышением температуры кривые смещаются в сторону высоких частот. С увеличением частоты величина удельной проводимости γ для обоих веществ увеличивается и в пределе стремится к некоторому постоянному значению γ_∞, которое можно трактовать как истинную проводимость этих материалов. В то же время, в области низких частот ε' достигает аномально высоких значений — до $1 \cdot 10^6$.

Полученные аномальные значения величины ε' наблюдаются либо в сегнетоэлектрических кристаллах [55], либо в материалах, обладающих межплоскостной или миграционной поляризацией [56]. Наличие в структуре ИФЭА-HCl (и, ввиду изоморфизма, в ИФЭА-HBr) отрицательно заряженных ионов хлора и положительно заряженных аминогрупп (рис. 11.27.) позволяет предполагать, что в этих молекулярных кристаллах при высоких частотах основным механизмом поляризации является дипольная поляризация. Исходя из этого величины $\varepsilon' = 10$–20, найденные для этих соединений при высоких частотах, являются типичными для веществ с дипольной поляризацией [57].

Механизм межплоскостной поляризации наблюдается при возникновении тонких нарушений или запорных слоев на поверхности отдельных кристаллитов в поликристаллических образцах или в приконтактной области кристалл-электрод. Прототипом такой структуры является двухслойный конденсатор Максвелла — Вагнера. В таком случае низкочастотное значение $\varepsilon'_{\text{н. ч.}}$ определяется как (схема 11.8):

$$\varepsilon'_{\text{н. ч.}} = \varepsilon' \cdot \frac{d_1}{d_2}, \tag{11.8}$$

где d_1 и d_2 — линейные размеры кристалла и нарушенного (запорного) слоя соответственно. Как ε', так и γ такой структуры имеют сильную частотную зависимость, с временем релаксации (схема 11.9)

$$\tau = \varepsilon_0 \cdot \frac{\varepsilon'_{\text{н. ч.}}}{\gamma_\infty}. \tag{11.9}$$

Величина γ берется по ее высокочастотному пределу. Если принять $\varepsilon'_{\text{н. ч.}} = 730\,000$ (при 70 °C), $\varepsilon' = 10$, $d_1 = 50$ мкм — толщина образца, то из выражения (11.8) получим из различных образцов $d_2 = 10$–20 Å, что близко к линейному размеру запорного слоя, возникающего иногда на контакте металл-полупроводник [58]. Значение частоты релаксации, рассчитанное по выражению 11.9 при $\gamma_\infty = 2{,}110^{-2}$ Ом · м (величина, полученная из измерений образца, данные по которому приведены на рис. 11.4), составляет $f = 500$ Гц, что хорошо совпадает с частотой максимума при этой температуре (рис. 11.30, кривая *1′*).

На основе полученных данных для обоих материалов были построены зависимости $\ln \gamma_\infty = f(1/T)$, представленные на рис. 11.32. Из рисунка видно, что при $T < 70$ °C эти зависимости могут быть с хорошим приближением аппроксимированы

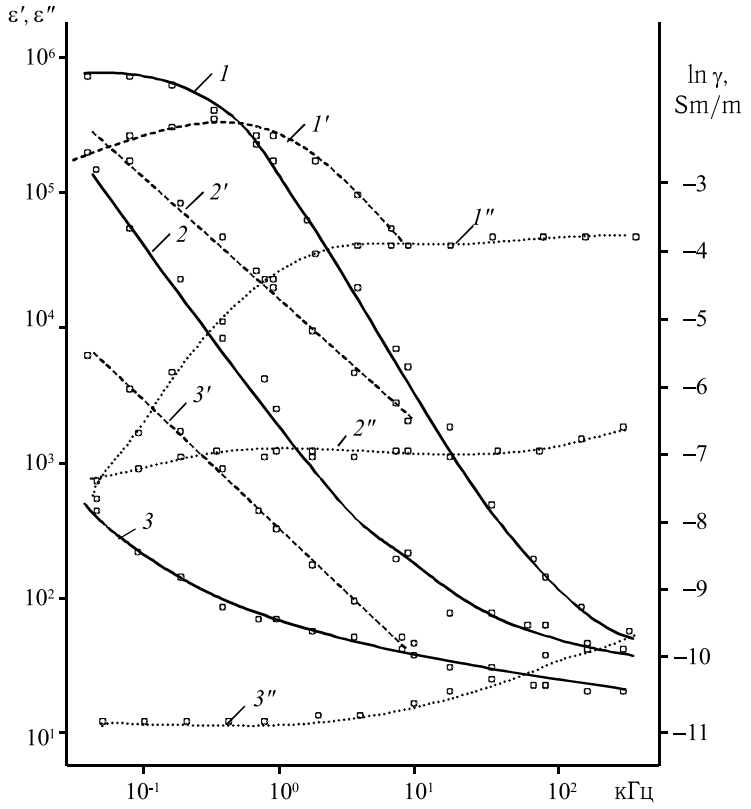


Рис. 11.30. Частотная зависимость комплексной диэлектрической проницаемости компонентов ε' и ε'' и проводимости γ для образцов ИФЭА-HCl при различных температурах: ε' — кривые *1–3*; ε'' — кривые *1′–3′*; γ — кривые *1″–3″*. Температура: 70 °C — для кривых *1*, *1′*, *1″*; 50 °C — для *2*, *2′*, *2″*; 20 °C — для *3*, *3′*, *3″*

прямыми линиями. Подобное поведение $\gamma_\infty(T)$ дает возможность предположить активационный характер проводимости, свойственный полупроводникам и диэлектрикам, и описать эту зависимость с помощью уравнения Аррениуса (схема 11.10)

$$\gamma = \gamma_0 \cdot \exp\left(-\frac{\Delta E}{kT}\right). \tag{11.10}$$

где γ_0 — гипотетическая проводимость при $T \to \infty$; ΔE — энергия активации проводимости; k — постоянная Больцмана; T — абсолютная температура.

Расчет значений ΔE в температурном пределе от 20 до 70 °C составляет 0,7–1,3 эВ для ИФЭА-HCl и 0,4–0,6 эВ для ИФЭА-HBr. Достаточно высокие (для диэлектриков) значения проводимости исследованных кристаллов позволяют предположить ее электронный характер. Однако, значительная величина энергии активации проводимости с точки зрения зонного характера электропроводности возможна в двух случаях. Это может быть либо за счет собственной электропроводности (но тогда величина запрещенной зоны должна составлять 3 эВ и требует построения зонной модели материала), либо за счет температурной ионизации примесей (роль

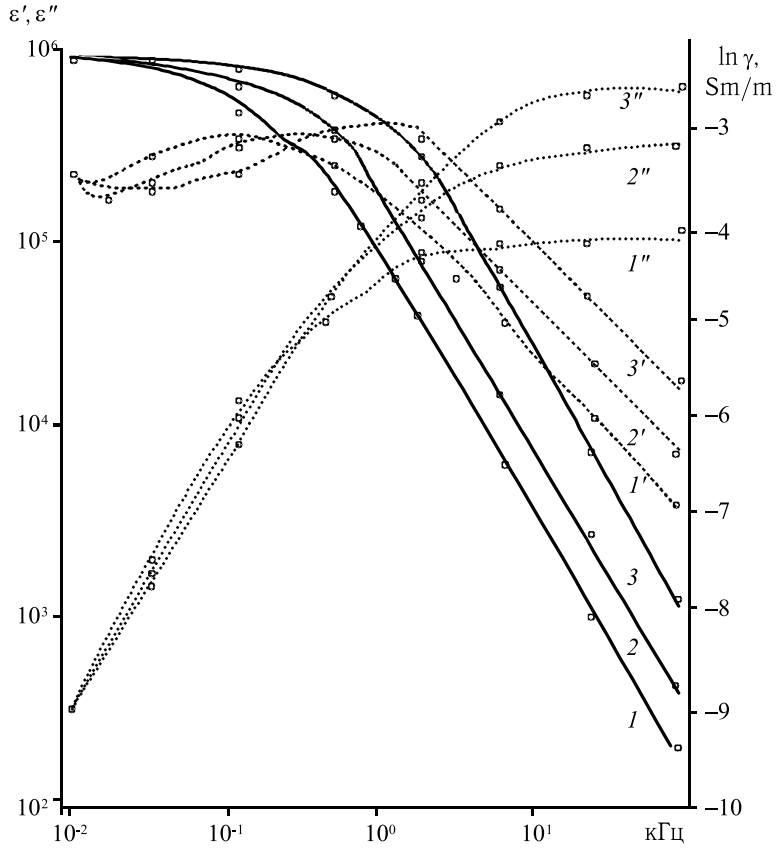


Рис. 11.31. Частотная зависимость комплексной диэлектрической проницаемости компонентов ε′ и ε″ и проводимости γ для образцов ИФЭА-HBr при различных температурах: ε′ — кривые *1–3*; ε″ — кривые *1′–3′*; γ — кривые *1″–3″*. Температура: 70 °C — для кривых *1*, *1′*, *1″*; 50 °C — для *2*, *2′*, *2″*; 20 °C — для *3*, *3′*, *3″*

которых могут играть ионы хлора или брома), что приводит к ширине запрещенной зоны в несколько электронвольт.

Прыжковый механизм электропроводности. В качестве альтернативы нами был предложен прыжковый механизм электропроводности [19, 21]. В частности, для случая ИФЭА-HCl предполагается, что часть первоначально свободных ионов хлора может образовывать водородные связи с системами HO–P=O-групп, имеющимися, как мы видели, в кристалле этого вещества (схема 11.11):

$$Cl^{-}\ldots H–O–P=O\ldots H–O–P=O.. \quad ..H–O–P=O\ldots \qquad (11.11)$$

Под действием тепловой энергии может иметь место разрыв связи H-O с образованием молекулы HCl и иона $^{-}$O–P=O (схема 11.12):

$$Cl–H\ldots {}^{-}O–P=O\ldots H–O–P=O.. \quad ..H–O–P=O\ldots \qquad (11.12)$$

Далее, под действием электрического поля будет происходить прыжковый перенос электрона (отрицательного заряда) вдоль цепи HO–P=O-групп с одновременным

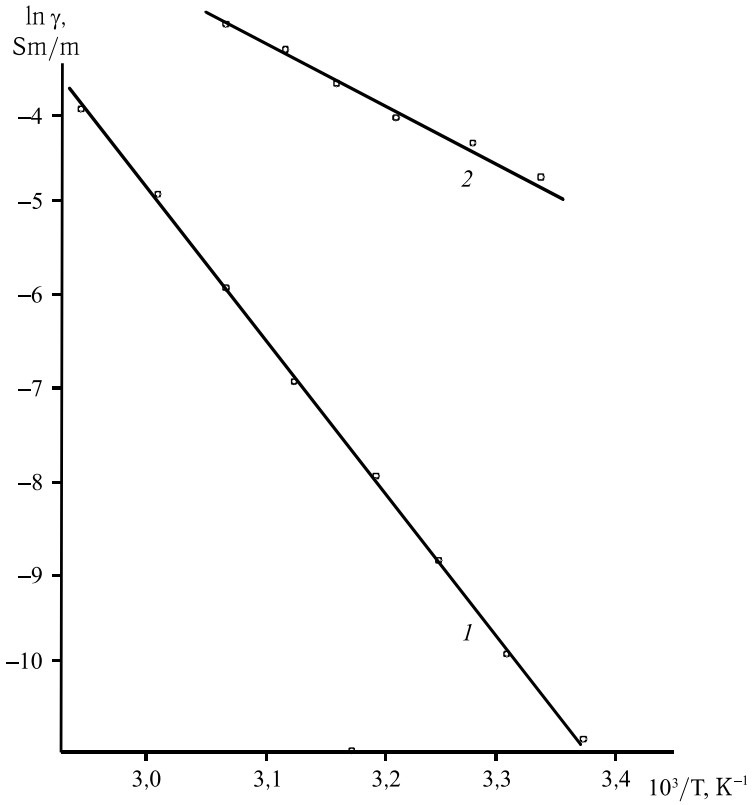


Рис. 11.32. Температурные зависимости удельной проводимости на участках высокочастотного насыщения для ИФЭА-HCl (*1*) и ИФЭА-HBr (*2*)

встречным кооперативным сдвигом протонов (схема 11.13):

$$
\begin{array}{lll}
\mathrm{Cl{-}H\ldots O{=}P{-}O^{-}\ldots H{-}O{-}P{=}O..} & \mathrm{..H{-}O{-}P{=}O\ldots} & a \\
\mathrm{Cl{-}H\ldots O{=}P{-}O{-}H\ldots {}^{-}O{-}P{=}O..} & \mathrm{..H{-}O{-}P{=}O\ldots} & б \\
\mathrm{Cl{-}H\ldots O{=}P{-}O{-}H\ldots O{=}P{-}O^{-}..} & \mathrm{..H{-}O{-}P{=}O\ldots} & в \\
\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots & & \\
\mathrm{Cl{-}H\ldots O{=}P{-}O{-}H\ldots O{=}P{-}O{-}H..} & \mathrm{..{}^{-}O{-}P{=}O\ldots} & n-2 \\
\mathrm{Cl{-}H\ldots O{=}P{-}O{-}H\ldots O{=}P{-}O{-}H..} & \mathrm{..O{=}P{-}O^{-}+H^{+}} & n-1 \\
\mathrm{Cl{-}H\ldots O{=}P{-}O{-}H\ldots O{=}P{-}O{-}H..} & \mathrm{..O{=}P{-}O{-}H} & n
\end{array}
\qquad (11.13)
$$

Такой перенос может осуществляться практически вдоль всего кристалла и заканчиваться, как показано на схеме 11.13 (стадия n), присоединением свободного водорода. После этого процесс может инициироваться в обратном направлении. В случае принятия этой модели энергия активации проводимости складывается из энергии, необходимой для начального разрыва связи H–O и энергии, требуемой для последующего прыжкового носителя заряда.

Поскольку описанный механизм является достаточно инерционным, то с повышением частоты электрического поля, длина продвижения носителя заряда вдоль цепи должна уменьшаться, что приводит к электрическим потерям, т. е. к увеличению проводимости γ_∞. Ее рост наблюдается экспериментально при комнатной темпера-

туре, начиная с $f = 2$ кГц (рис. 11.30). При повышении температуры электрические потери за слет инерционности механизма электропроводности начинают играть заметную роль на более высоких частотах, что также наблюдается. Исходя из данного механизма, величина проводимости кристаллитов будет определяться концентрацией вводимых в них ионов галогена, что может быть предметом дальнейших исследований. В целом данная модель не противоречит полученным данным и позволяет допустить возможность переноса зарядов по системам HO–P=O-групп.

Сопоставление с литературными данными. До настоящего времени большинство исследований органических проводников и полупроводников направлено на изучение соединений, содержащих полисопряженные связи, таких как полиацетилен, поли-(р-фениленвинилен) и его производные, фталоцианины, олигопорфирины и др.[59, 60]. Все они характеризуются относительно низкими значениями сопротивления ($10–10^5$ Ом · см) энергии активации ($< 0{,}5$ эВ). Некоторые из них, например, фталоцианины, имеют близкое отношение к биомолекулам, что позволило предположить, что биомолекулы и биоструктуры являются своеобразными полупроводниками [61], что стимулировало их исследование [62]. Однако, интерес к исследованию биомолекул, возникший в 50-е годы прошлого века, в скором времени угас, поскольку большинство их них в условиях проводимых измерений оказались диэлектриками, а не полупроводниками. Оно и понятно. Как правило, биоматериалы изучали в виде порошков на постоянном токе при напряжениях 12–120 вольт и выше, под давлением до 100 атм/см^2. Влага из образцов при этом удалялась под вакуумом. С современных позиций исследование белков при таких условиях выглядит как грубое нарушение их нативных свойств. Однако и более простые соединения, такие как аминокислоты, азотистые основания, карбоновые кислоты проявляли сопротивления и энергии активации в пределах от 106 до 1016 Ом/см и 2–6 эВ, соответственно [63–66].

В нашем случае сопротивление образцов при высоких частотах, вычисленное на основе наших данных (рис. 11.30 и 11.31) составляло порядка 10^4 Ом · см. При этом энергия активации варьировала от 0,7–1,3 эВ для ИФЭА-HCl до 0,5 эВ ИФЭА-HBr. Чтобы сравнить наши данные, полученные на переменном токе с данными, полученными на постоянном токе, мы провели измерения наших образцов на постоянном токе. Как оказалось, сопротивление образцов сильно зависело от продолжительности применения напряжения. Так, в течение 30 минут сопротивление образца ИФЭА-HCl увеличивалось на порядок величины при постоянном токе 1 mA. Обращение полярности приводило к постепенному снижению сопротивления, которое восстанавливалось до первоначального значения через 30 минут. Поведение ИФЭАНBr было аналогичным. Такое поведение может быть объяснено, по крайней мере частично, асимметричным положением протонов в системах HO–P=O-групп в кристаллах этих соединений, которые в течение 30 минут перемещались из одного положения в другое, участвуя в этот период в процессах переноса зарядов.

Связь с моделью переноса зарядов по ССИВС. Легко видеть, что предложенный для объяснения аномальной диэлектрической проницаемости и низких величин энергии активации прыжковый механизм электропроводности практически полностью совпадает с моделью переноса зарядов по ССИВС (раздел 5.2.). Оно и не могло быть иначе, поскольку системы HO–P=O-групп являются частным случаем ССИВС, состоящих и резонансных групп (раздел 5.1.4, схема 5.25). Полученные материалы ИФЭА-HCl и ИФЭАНBr по своим свойствам (низкое сопротивление и энергия активации) являются первыми примерами искусственных бионических сред основе

ССИВС, пригодными для создания наноструктур. Дальнейшее их обсуждение будет продолжено в разделе 11.4.6.

11.4.4.1. ***Процедура оптимизации структуры кристаллов ИФЭА-HCl.*** Данные по структуре ИФЭА-HCl, в которой выявлены зоны ССИВС из HO–P=O-групп, были использованы сотрудниками кафедры квантовой химии СПБ ГУ для исследования свойств атомов в кристалле этого соединения методами квантовой химии [67].

Следует отметить, что теоретический анализ описанной в работе [19] структуры представляет довольно сложную задачу. Во-первых, в данных по РСА представлены с достаточной точностью только координаты тяжелых атомов (C, N, O, P), в то время как координаты атомов водорода не были определены. Во вторых, вследствие низкой симметрии кристаллов, его элементарная ячейка содержит слишком большое число атомов, что делает практически невозможным неэмпирический квантовохимический расчет, например, методом LCAO Хартри–Фока. Чтобы решить эти проблемы был разработан комбинированный подход. На первой стадии была применена менее громоздкая и требующая небольшого машинного времени процедура молекулярной механики (ММ) для получения оптимальной конфигурации молекул. Затем, на второй стадии, базируясь на полученных данных, был проведен неэмпирический расчет методами квантовой химии с целью получения электронной структуры.

Для проведения ММ расчета была использована программа GULP (General Utility Lattice Program) [68], которая имела ряд преимуществ по сравнению с другими аналогичными программами. В частности, она позволяет иметь дело с периодическими системами, к которым относятся и кристаллы ИФЭА-HCl. Процедура оптимизации была проведена в следующих вариантах:

1. Процедуре оптимизации были подвергнуты только координаты тех атомов, которые были определены с большой экспериментальной ошибкой (все атомы водорода и один атом углерода — C^4) — частичная оптимизация I.

2. Полная оптимизация положения всех атомов — полная оптимизация II.

3. Полная оптимизация структуры, которая предполагает перенос протонов межу соседними молекулами вдоль водородной связи — полная оптимизация III. Этот вариант включает два случая: транспорт протона во всех молекулах ИФЭА-HCl, принадлежащих к A и A′ типам (случай III, *a*); перенос протона в молекулах ИФЭА-HCl, принадлежащих только к A′ типу (случай III, b).

11.4.4.2. ***Результаты квантовохимического расчета электронной структуры кристаллов ИФЭА-HCl.*** После процедуры оптимизации был проведен квантовохимический расчет электронной структуры кристаллов ИФЭА-HCl неэмпирическим методом Хартри–Фока по программе CRYSTAL [69] в базисе ЛКАО. Для упрощения расчетов была выбрана несколько иная элементарная ячейка кристалла ($C2/C_{11}$), которая содержит 240 атомов (4 молекулы типа A и четыре молекулы типа A′, по тридцать атомов в каждой). В самосогласованном расчете кристалла учтены 8 точек зоны Бриллюэна, полученных делением на 2 каждого из трех примитивных векторов трансляции обратной решетки моноклинной сингонии. За счет специального выбора примитивной ячейки в установке $C2/C_{11}$ исследовано взаимодействие ячеек кристалла вдоль направления *c* упорядочения биослоев кристалла. Было установлено, что взаимодействие примитивных ячеек вдоль этого направления пренебрежимо мало, так что кристалл можно считать двупериодическими.

В результате расчета электронной структуры кристалла, проведенного авторами в работе [67], было получено, что он является неметаллом, что согласуется с приведенными выше данными (раздел 11.4.3) [19, 21].

На основе анализа заселенностей по Малликену, обобщенного на кристаллические системы, были рассчитаны атомные заряды, порядки межатомных связей и атомные валентности [67]. Получено, что в молекулах A и A′ распределение электронной плотности различается незначительно. При этом отрицательно заряжены атомы фосфора ($-0{,}78e$), хлора ($-0{,}80e$), кислорода (от $-0{,}3e$ до $-0{,}5e$ на неэквивалентных атомах) и азота ($-0{,}94e$). Атомы углерода также имеют небольшой ($0{,}2$–$0{,}3e$) заряд. При этом была выявлена существенная неэквивалентность по атомному заряду различных групп водородных атомов. Наибольший положительный заряд ($+0{,}6e$) был получен для атомов водорода в группах, содержащих атомы фосфора и кислорода, т. е. в системах HO–P=O-групп. Это означает, что атомы водорода этих групп являются скорее протонами, чем ковалентно связанными атомами, т. е. они обладают высокой подвижностью в этих в системах. Это также согласуется с возможностью скачкообразного механизма переноса зарядов по системам из HO–P=O-групп (раздел 11.4.3). В то же время, атомы водорода в остальных группах имеют существенно меньший (от $0{,}1e$ до $0{,}3e$) положительный заряд.

11.4.4.3. ***Фосфатные группы как активаторы переноса зарядов по ССИВС биомембран: гипотеза.*** Приведенные результаты, несмотря на кажущуюся простоту, имеют принципиальное значение для всей проблемы переноса зарядов по ССИВС. Мы уже высказывали идею о важности участия HO–P=O-групп различных кофакторов в составе ССИВС и их возможной их активирующей роли в процессах переноса зарядов по ССИВС (раздел 10.3.4.). В разделе 11.3.2.2 на конкретном примере было показано участие в ССИВС этих групп, принадлежащих молекулам ФЛ. Полученные расчетным путем данные о высокой подвижности атомов водорода в системах HO–P=O-групп аналогов ФЛ можно экстраполировать. Присоединение к ССИВС депротонированных $^{-}$O–P=O-групп будет придавать более высокую подвижность протонам, входящим и в другие группы этих систем, например, в HN–C=O-группы пептидных связей и прочие группы ССИВС (см. раздел 5.1.2) и инициировать перенос зарядов по механизму, описанному в разделе 5.2. Формулируя гипотезу о принципиальной значимости HO–P=O-групп как активаторов и инициаторов переноса зарядов, а по существу, доноров зарядов в ССИВС, мы хотим привлечь внимание специалистов к изучению роли этих групп в процессах переноса зарядов в биоструктурах. Предполагается, что без этих групп такая возможность была бы существенно меньшей, если не вообще существовала бы.

11.4.5.1. ***Обоснование подхода по моделированию биомембран с участием молекул холестерина.*** Как упоминалось выше (раздел 11.2.4.2.), зонно-блочная модель предполагает существование в мембранах структурно-функциональных ансамблей, с участием, белков, ФЛ и молекул пигментов или холестерина (см. рис. 11.8). Поэтому для более полного приближения к модели биомембран необходимо, чтобы помимо аналогов ФЛ в состав модельных кристаллов входили бы также стерины, способные внести вклад в формирование таких ансамблей. Это послужило основанием к поиску возможных комплексов между аналогами ФЛ и другими компонентами биомембран. В разделе 11.2.2.4 была описана структура кристаллического комплекса, полученного из изобутанола (ИБ) и содержащего ИФХ, ИБ и воду. Использова-

ние ИБ в качестве растворителя позволило получить еще один кристаллический комплекс ИФХ — с холестерином и ИБ. Хотя исследований структуры кристаллов холестерина и его производных довольно много, нам не известны работы, в которых проводилось бы изучение структуры комплексов холестерина с аналогами ФЛ. Целью нашей работы было получение комплексов ИФХ с холестерином, их кристаллизация, изучение молекулярной и кристаллической структуры, а также сопоставление этой структуры с зонно-блочной моделью биомембран.

11.4.5.2. ***Роль холестерина в биомембранах.*** К числу наиболее распространенных липидных молекул, входящих в структуру биомембран эукариотических организмов, относится холестерин, описанию свойств которого посвящен ряд монографий и обзорных статей [70–77]. Его структура, как известно, состоит из циклопентанпергидрофенантре-нового ядра (ЦПФ-ядро), составленного из трех шестичленных циклов (A, B, C) и одного пятичленного (D), а также боковой цепи [70]. Холестерин является спиртом и имеет C-OH-группу в третьем положении.

В структуре биомембран холестерин связан с белками, причем степень их связи, по-видимому, зависит от типа участвующего во взаимодействии белка [74]. Доля холестерина может составлять почти половину от общего содержания липидов в биомембранах. Наибольшее процентное содержание его приходится на окружающие клетку плазматические мембраны, в то время как в других типах мембран (эндоплазматическом ретикулуме, ядерных мембранах) его количество незначительно [74]. В пределах бислойной структуры биомембран холестерин может располагаться как симметрично, так и асимметрично в наружном и внутреннем монослоях [73].

В состав многих мембран, в частности, миэлиновых, холестерин входит в эквимолярном с фосфолипидами (ФЛ) соотношении [71, 72], что допускает возможность образования комплексов между ними. Такие комплексы были обнаружены в смешанных липид-холестериновых мицеллах. Для их изучения обычно используют чистые синтетические ФЛ (например, дипальмитоил-фосфатидилхолин), и различные стерины, в частности, холестерин (см. работу [76] и ссылки в ней). Результаты этих работ показывают, что в бислойных липидных мембранах ЦПФ-ядро и гидрофобная боковая цепь холестерина ориентированы параллельно цепям жирных кислот ФЛ. При этом боковые цепи молекул холестерина локализованы во внутренней части бислоя, а C-OH-группы ЦПФ-ядер — вблизи сложно-эфирных связей молекул ФЛ на водно-мембранной границе [74, 77].

Данные электронной микроскопии показывают, что в искусственных фосфолипид-холестериновых комплексах расположение холестерина носит упорядоченный характер [77]. В биомембранах, обработанных антибиотиком филипином [78], этим методом также выявлены периодически повторяющиеся структуры (филипин-холестериновые комплексы). Однако характер укладки холестерина и его комплексов с ФЛ в биомембранах до настоящего времени точно не известен.

11.4.5.3. ***Метод получения комплекса ИФХ с холестерином.*** Для получения комплексных кристаллов был использован ранее синтезированный нами ИФХ [20] и чистый холестерин (фирма «Calbiochem»). В качестве растворителя использовали ИБ [20].

Поиск комплексов ИФХ с холестерином вели путем анализа свойств кристаллов, образующихся при различных соотношениях ИФХ-холестерин в результате испарения растворителя (ИБ). При этом был использован метод наблюдения кристаллов под

микроскопом, снабженным приставкой для регулирования температуры смотрового столика («Nagema», Германия), что позволяло проследить за изменениями их агрегатного состояния и двупреломления в зависимости от температуры. В результате были обнаружены кристаллы, которые по своим свойствам ($T_{\text{пл.}} = 170$ °C, наличию фазового перехода при $T = 75$–80 °C) существенно отличались как от свойств исходных ИФХ ($T_{\text{пл.}} = 240$ °C) и холестерина ($T_{\text{пл.}} = 149$ °C), так и от полученного ранее комплекса ИФХ с изобутанолом [20].

Найденные соотношения компонентов и условия выращивания кристаллов состоят в следующем. Навески ИФХ (26 мг) и холестерина (19,4 мг)(молярное соотношение 2 : 1), взвешивали в микропробирках на 5 мл. Оба компонента вместе растворяли в 400 мкл изобутанола (можно при нагревании). Кристаллы выращивали в эксикаторе методом скошенного мениска путем медленного испарения растворителя при относительной влажности 12 % (над пересыщенным водным раствором LiCl). Рост кристаллов проходил при комнатной температуре, обычно за 7–10 суток. На дне микропробирки оставляли немного жидкости. Отметим, что несмотря на двухкратный избыток ИФХ, соотношение ИФХ : холестерин в комплексах, как показали наши исследования, оказалось сдвинутым в сторону последнего (1:3).

Для расшифровки структуры кристаллов были необходимы сведения о составе и соотношении в них компонентов. Убыль массы, полученная после высушивания навесок кристаллов при 50–70 °C до постоянного веса, составляла примерно 15 %, что было отнесено за счет испарения включившегося в структуру изобутанола. Содержание фосфора в кристаллах составило $1{,}95 \pm 0{,}02$ %, что доказало также наличие ИФХ в структуре кристаллов. Проведенный на основе этих данных теоретический расчет показал, что в кристаллах, в отличие от исходной смеси, на одну молекулу ИФХ приходится 3 молекулы холестерина и 3 молекулы изобутанола, что было подтверждено последующей расшифровкой их структуры.

11.4.5.4. ***Результаты рентгеноструктурных исследований.*** **Строение комплекса.** Методом РСА была изучена структура полученного комплекса [22]. Кристаллы ИФХ-холестерин-ИБ кристаллизуются в моноклинной сингонии (пр. гр. $P2_1$) с параметрами $a = 16{,}994(10)$, $b = 11{,}314(7)$, $c = 28{,}164(15)$, $\beta = 104{,}07(3)$, $V = 5252{,}63$ Å^3, $Z = 2$, $D_{\text{calc}} = 1{,}0273$ г/см^3. В независимой части ячейки расположены: одна молекула ИФХ, три молекулы холестерина (ХОЛ 1, ХОЛ 2, ХОЛ 3) и три молекулы изобутанола (ИБ 1, ИБ 2, ИБ 3). Последнее означает, что кристаллический комплекс является сольватом. В работе [22] приведены координаты атомов в долях элементарной ячейки, параметры тепловых колебаний (is/eq) и геометрические параметры молекул (межатомные расстояния и углы). Взаимное расположение молекул в комплексе и нумерация атомов в структуре показана на рис. 11.33. В молекулах ИФХ и ИБ нумерация атомов аналогична приведенной в работе [21], а в молекулах холестерина — соответствует общепринятой номенклатуре [70], но с верхними индексами, означающими номер молекулы в кристалле.

В работе [22] подробно обсуждаются особенности конформации молекул ИФХ и холестерина, а также их взаимная укладка. Как видно на рис. 11.33, основным структурообразующим элементом комплекса выступает молекула ИФХ, к атому кислорода O_1 которой водородными связями присоединены молекулы ИБ 1 и ИБ 3, а к атому O_3 — молекулы Хол 1 и Хол 2. Молекула ИБ 2 образует водородную связь с O_1^1 Хол 1, а молекула Хол 3 — с O_7 молекулы ИБ 2.

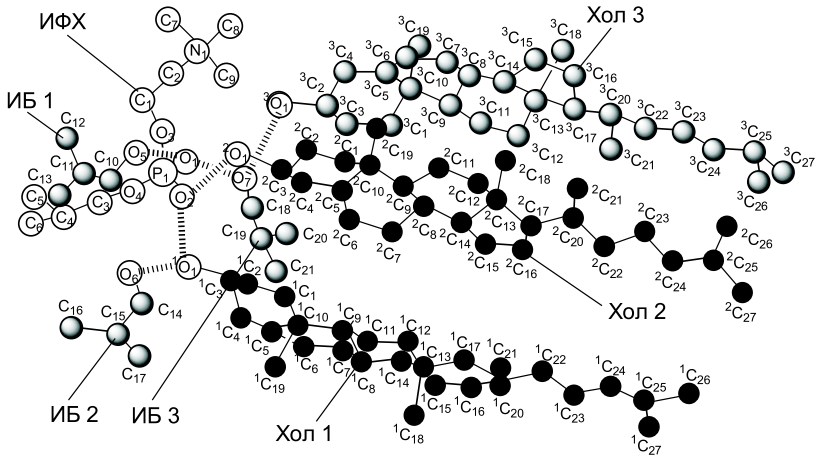


Рис. 11.33. Конформация и укладка молекул и нумерация атомов в комплексе ИФХ-холестерин-ИБ (1 : 3 : 3). ИБ 1–ИБ 3 — молекулы изобутанола; Хол 1–Хол 3 — молекулы холестерина. Более удаленные молекулы холестерина и ИБ показаны полутоном

Упаковка молекул в кристалле. Характер упаковки комплекса в кристалле показан на рис. 11.34 и 11.35. Как видно из рис. 11.34, *а*, кислород O_2 фосфатной группы молекулы ИФХ из независимой части ячейки сближен с атомом азота $N^+(CH_3)_3$-группировки другой молекулы ИФХ, связанной с исходной поворотом вокруг винтовой оси второго порядка. Расстояние между этими атомами — 4,77 Å — соответствует длине ионной связи. Дальнейшая трансляция группировки из этих двух молекул вдоль оси b элементарной ячейки приводит к образованию непрерывной цепочки из молекул ИФХ, имеющих противоположную ориентацию аминоэтильных фрагментов. При этом аминоэтильные фрагменты лежат в плоскости примерно параллельной плоскости ab, а изобутильные фрагменты примерно перпендикулярны этой плоскости. Поскольку молекулы ИФХ связаны двойной винтовой осью и на ячейку приходится две молекулы ИФХ, то образуется два параллельных оси b ряда изобутильных фрагментов, ориентированных в разные стороны относительно плоскости аминоэтильных фрагментов. Такая взаимная ориентация молекул обеспечивает образование бислоя, в котором диглицеридные остатки молекул ФЛ замещены изобутильными. На этом же рисунке видно, что другой свободный атом кислорода (O_1) фосфатной группы из молекулы ИФХ, связанной с базисным осью второго порядка, также ориентирован на атом азота $N^+(CH_3)_3$-группировки базисной молекулы. Расстояние между этими атомами — 5,40 Å, что несколько больше расстояния O_2–N. Однако, наличие противоположных зарядов на фосфатной и триметиламмонийной группировках и отсутствие экранирующих групп позволяет трактовать это взаимодействие как ионное. Таким образом, в плоскости аминофосфатных фрагментов можно выделить две системы ионных взаимодействий, обеспечивающих связь молекул ИФХ в направлении оси b, показанных на рисунках 11.34, *а* и 11.34, *б* пунктиром. Отметим, что подобная укладка молекул ИФХ в данном кристалле, обнаруженная также в кристаллах модельного фосфатидилхолина моногидрата [79], полностью соответствует той, какую мы предложили в модели биомембран (ср. с рис. 11.11). Это означает, что подобная укладка — не плод нашей фантазии, а действительно

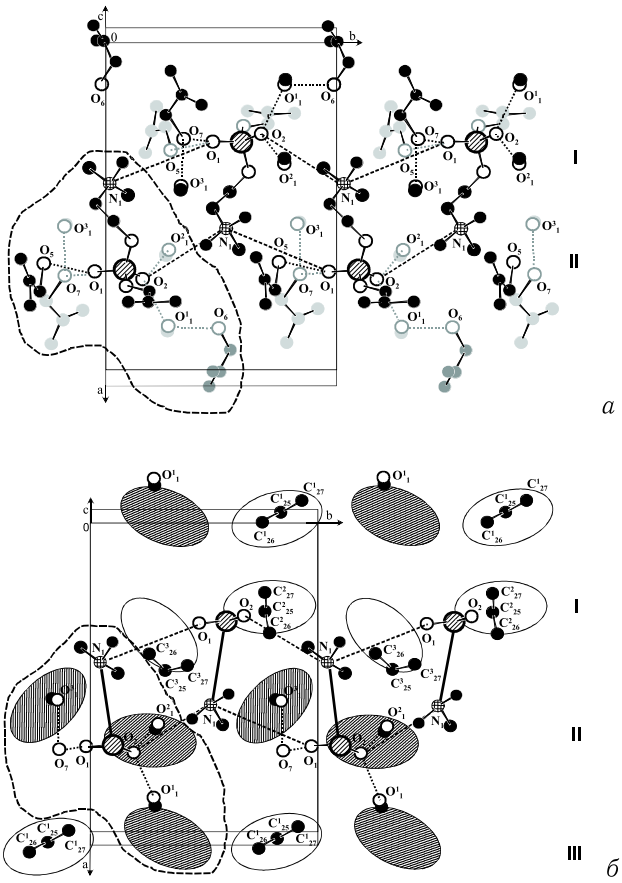


Рис. 11.34. Проекция элементарной ячейки кристаллов комплекса ИФХ · холестерин · ИБ (1·3·3) на плоскость a, b: *а* — схема водородных связей (частый пунктир) и ионных взаимодействий (редкий пунктир); сечение по оси c — от 0,35 до 0,65. Показаны только C–O-группы молекул холестерина. Молекулы, расположенные позади ряда молекул изобутилфосфохолина, показаны полутоном. Комплекс из независимой части ячейки обведен пунктирной линией. *б* — схема укладки молекул холестерина (изображены в виде эллипсов). Сечение по оси c — от 0,5 до 1,0. Молекулы холестерина, ориентированные к ряду молекул изобутилфосфохолина C–OH-группами — заштрихованы, а боковой ветвью — не заштрихованы

может реально существовать. В данном комплексе ее стабильность обеспечивает присутствие молекул холестерина, которые присоединены к бислою через систему водородных связей.

Из рис. 11.34 видно, что все молекулы холестерина ориентированы примерно перпендикулярно плоскости бислоя. При этом оси молекул холестерина, проведенные через плоскости циклов и алифатическую боковую цепь, почти параллельны оси c. Все три молекулы холестерина из независимой части ячейки, связанные с одной молекулой ИФХ, ориентированы боковыми цепями вниз от плоскости рис. 11.34, *б*. При этом две из них (Хол 2 и Хол 3) лежат примерно на одном и том же уровне в плоскости bc, тогда как третья (Хол 1) расположена на другом уровне. Винтовая

ось второго порядка, проходящая вдоль направления [010] через точку 1/2,0,1/2, размножает этот фрагмент, обращая направления боковых цепей холестерина в противоположную сторону от плоскости бислоя (незаштрихованные эллипсы). Таким образом в ячейке образуется три слоя молекул холестерина, перпендикулярных плоскости ab и параллельных плоскости bc: два слоя (на рис. 11.34, *б* слои I и II) состоят из одинаково ориентированных в пределах каждого слоя молекул, но противоположно направленных относительно друг друга, тогда как слой III состоит из молекул чередующихся ориентаций. В слое III одна молекула холестерина принадлежит базисному фрагменту, а другая — нижележащей ячейке. При этом в слоях I и II содержатся молекулы ИФХ, а в слое III их нет.

На рис. 11.35, *а* представлена проекция сечения ячейки, перпендикулярного оси a (0,25–0,45) и проходящего через слой молекул холестерина с одинаковой ориентацией боковых цепей. Как видно из рисунка, молекулы холестерина ячейки смежной по плоскости ab, связанные с молекулами рассматриваемого слоя винтовой осью, формируют чередующиеся накладывающиеся слои противоположной ориентации. При этом сохраняется одинаковая ориентация молекул внутри каждого слоя. Сечение ячейки параллельное первому (0.95–1.05), проходящее через слой молекул холестерина с чередующейся ориентацией боковых цепей показано на рис. 11.35, *б*. Из рис. 11.35, *а* и 11.35, *б*, также следует, молекулы холестерина из смежных ячеек в обоих сечениях взаимно проникают друг в друга на длину боковых цепей, тогда как области ЦПФ-ядер не перекрываются. Связь между боковыми цепями и циклическими фрагментами молекул холестерина из смежных по плоскости ab ячеек осуществляется за счет ван-дер-ваальсовых взаимодействий. Следует отметить, что полученная нами укладка молекул холестерина существенно отличается от упаковки молекул в кристаллах безводного холестерина, холестерина моногидрата и ряда его производных [75]. Анализ причин таких отличий приводит нас к выводу, что полученная нами укладка является следствием образования комплекса холестерина с O=P–O^--группами ИФХ, с последующей трансляцией вдоль винтовой оси второго порядка и формированием бислоя из молекул ИФХ, скрепленного за счет ионных взаимодействий.

Таким образом, заканчивая рассмотрение структуры полученного комплекса ИФХ-холестерин-ИБ, еще раз подчеркнем, что в данном комплексе наблюдается чередование бислоев, образованных молекулами ИФХ и разделяющих их плоско параллельных слоев холестерина. Хотя соответствие этой структуры и реальных холестеринсодержащих биомембран еще предстоит выяснить, мы полагаем, что в данном комплексе наилучшим образом удалось воспроизвести те представления об укладке молекул ФЛ в биомембранах, которые соответствуют зонно-блочной модели.

11.4.6. Перспективы развития предложенного а подхода по физической реконструкции зонно-блочной модели биомембран. Изложенный выше раздел 11.4 был посвящен полностью физической реконструкции зонно-блочной модели биомембран. Приведенные работы далеко не исчерпывают возможности данного подхода и могут служить лишь первыми шагами в этом направлении. Вместе с тем, уже на основе полученных данных можно наметить некоторые перспективы для дальнейших исследований и использования результатов в бионическом направлении наноэлектроники.

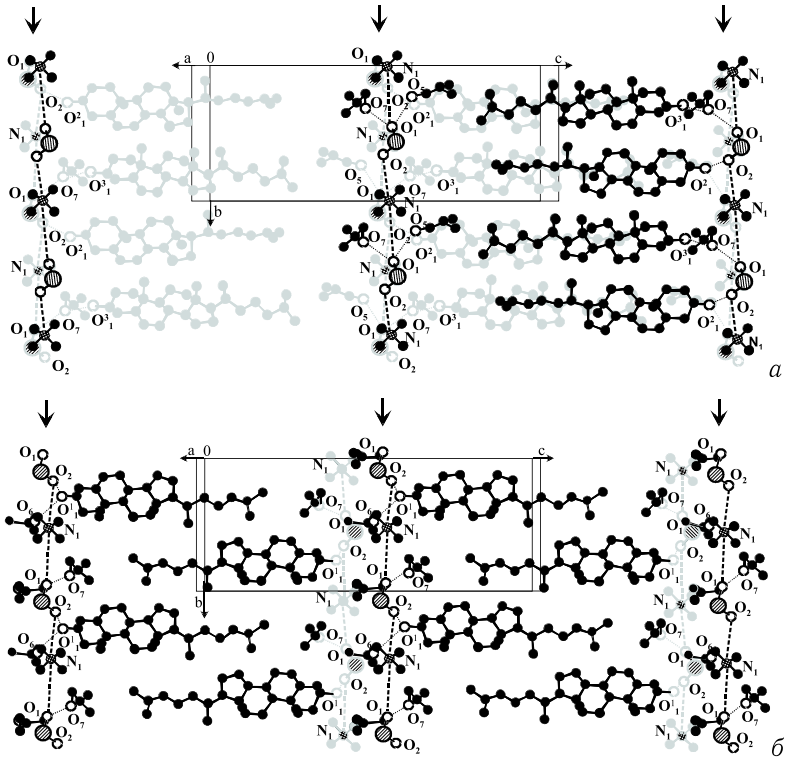


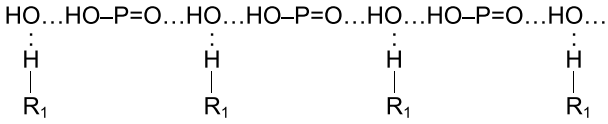
Рис. 11.35. Проекция элементарной ячейки кристаллов комплекса ИФХ · холестерин · ИБ (1· 3· 3) на плоскость b, c: *а* — слои молекул холестерина, расположенные в интервале от 0,30–0,80 по оси a. Слева верхний слой молекул холестерина снят, чтобы показать нижележащий слой (изображен полутоном); *б* — слой молекул холестерина, локализованных в интервале от 0,90 до — 1,10 по оси a

Так, галогенгидридные производные ИФЭА (разделы 11.4.2.2, 11.4.3 и 11.4.4) могут иметь далеко идущее применение. Тот факт, что в полученных нами зонах из HO–P=O-групп (схема 11.3., рис. 11,27, *б*) атомы водорода обладают повышенной подвижностью, позволяет использовать соединения с такой структурой для введения функциональных молекул, которые через подобные ССИВС могли бы работать как функциональные микросхемы. Для этих целей, видимо, лучше использовать галогенгидридные аналоги ИФЭА с длинными цепями, с которыми можно работать на пленках Лэнгмюра–Блоджетт.

Аналогичные соображения можно высказать по поводу результатов исследования структуры кристаллов ИФХ моногидрата и комплекса ИФХ моногидрата с изобутанолом (разделы 11.4.2.3 и 11.4.2.4). Хотя эти структуры не совпадают нашими с представлениями об укладке молекул ФХ (согласно зонно-блочной модели биомембран), они все же могут быть интересны для целей наноэлектроники. Так, если бы удалось получить структуру, в которой атомы водорода расположены асимметрично (схема 11.14):

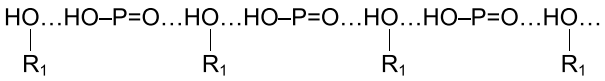
$$\text{HO...HO–P=O...HO...HO–P=O...HO...HO–P=O...HO..}, \qquad (11.14)$$

то такая ССИВС могла бы стать основой для прикрепления элементов (R_1–H), согласно схеме 11.15:



(11.15)

Эта же система могла бы быть каналом для передачи сигналов между элементами. Например, возбуждая светом молекулу в одном участке кристалла, сигнал от нее будет передаваться в другую часть кристалла. Вместо молекул воды для целей создания цепочек с асимметричным положением атомов водорода можно использовать молекулы, потенциально способные создавать такую асимметрию, например, соединения типа фенолов, многоядерных хинонов и т. д. (схема 11.16):



(11.16)

Кроме гидроксилсодержащих соединений могут быть использованы также соединения, содержащие C–NH- и C–SH-группы. Таким образом, укладка фосфохолиновых группировок, которая как мы отмечали в разделе 11.4.2.3., обладает устойчивостью и консерватизмом, может быть использована как каркас, пригодный для встраивания в него различных типов молекул. Благодаря формирующимся ССИВС они могут работать как единый ансамбль. Это открывает путь к использованию молекул ИФХ и других аналогов для целей наноэлектроники.

Что касается полученных нами комплексных кристаллов ИФХ с холестерином и изобутанолом, то результаты этих исследований могут иметь значение для решения проблемы укладки молекул ФЛ и холестерина в биомембранах. В этом комплексе мы впервые получили укладку биполярных головок ФЛ, соответствующую зонно-блочной модели биомембран. При этом укладка молекул холестерина оказалась перпендикулярной зоне молекул ИФХ. На основе разработанной методики кристаллизации можно провести серию работ с использованием различных типов стеринов. Кроме того, введение в среду пептидов, имеющих происхождение из холестеринсодержащих биомембран, может привести к получению еще более сложных комплексов, приближающихся по структуре к реальным мембранам. В свою очередь, результаты изучения этих структур могут быть использованы в технике.

В то же время, нельзя не отметить, что развитие этого направления *на основе простых молекул* может иметь лишь ограниченный характер, поскольку возможности совместной кристаллизации для получения заранее заданной структуры наноэлектронной схемы весьма ограничены. Гораздо перспективнее нам представляется развитие подхода на основе синтеза линейных цепных полимеров с набором функциональных модулей, способных к самоорганизации в пространственную схему (см. гл. 8 и 9). Поэтому имеет смысл лишь построение сверхсложных мембранных структур на основе готовых надмолекулярных блоков. Рекомендации для этого, вытекающие из изложенного как теоретического, так и экспериментального материала даны в завершающем разделе этой главы.

11.4.7. Общие рекомендации по конструированию мембранных структур. Как и в предыдущих главах (см., например, разд. 10.6), перечислим общие рекомен-

дации по построению мембранных структур как молекулярных БИС, которыми могут руководствоваться конструкторы при их разработке:

— как молекулярные БИС мембранные структуры должны строиться из обладающих симметрией олигомерных структур, содержащих зоны ССИВС ближнего порядка;

— взаимосвязь отдельных структур (функциональных блоков) и обеспечение целостности БИС должны осуществлять специальные молекулы-«скрепки», способные формировать протяженные зоны ССИВС дальнего порядка;

— в зонно-блочной модели биомембран на роль «скрепок» оказались пригодны молекулы ФЛ; в современных исследованиях проявляется тенденция к выявлению этой роли ФЛ в биомембранах, хотя до конца она пока не выявлена; для создания искусственных мембранных структур возможно изобретение и использование других молекул-«скрепок».

— оси симметрии олигомерных структур должны быть перпендикулярны плоскости мембраны, что обеспечивает формирование двумерных периодических структур (мы показали это как в процессе теоретического анализа, так и на реальных биомембранах);

— ввиду большой протяженности ССИВС необходимы группировки, способствующие большей подвижности протонов в этих системах; предполагается, что наиболее подходящими для этих целей являются HO–P=O-группы различных молекул (кофакторов, ФЛ, фосфорилированных боковых цепей аминокислот и т. д.).

Работа мембранных структур не ограничивается только фиксацией на них ансамблей, обладающих каталитическими свойствами. Являясь границей раздела, она может содержать устройства, обеспечивающие избирательное пропускание одних веществ и задержку других. Кроме того, на поверхности таких структур могут находиться специфические рецепторы, создающие основу для управления состоянием этих структур. Последний вопрос, с позиции концепции ССИВС, рассмотрен в заключительной главе нашей книги.

Литература к главе 11

1. *Карасев В.А.*, *Лучинин В.В.*, *Стефанов В.Е.* Как построить биочип? // Биотехнология. 1993. № 2. С. 3–15.
2. *Karasev V.A.*, *Luchinin V.V.*, *Stefanov V.E.* A Model of Molecular Electronics Based on the Concept of Conjugated Ionic-Hydrogen Bond Systems // Adv. Mater. Opt. Electron. 1994. V. 4. P. 203–218.
3. *Карасев В.А.* О роли систем сопряженных ионно-водородных связей в надмолекулярных структурах // Вестник Ленингр. ун-та. 1974. № 9. С. 74–86.
4. *Карасев В.А.*, *Стефанов В.Е.* Об ориентации липидов в биомембранах // Биофизика. 1985. Т. 30. С. 351–352.
5. *Blaurock A.E.* Evidence of bilayer structure and of membrane interactions from X-ray diffraction analysis // Biochim. Biophys. Acta. 1982. V. 650. P. 167–207.
6. *Singer S.J.*, *Nicolson G.L.* The fluid mosaic model of structure of cell membranes // Science. 1972. V. 175. P. 720–731.
7. *Vandercooi G.*, *Green D.E.* Biological model structure.I. The protein crystal model for membranes // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1970. V. 66. P. 615–621.
8. *Mouritsen O.G.*, *Andersen O.S.* Do we need a new biomembrane model? // Biol. Skr. Dan.Vid. Selsk. 1998. V. 49. P. 7–12.
9. *Бауэр Э.С.* Теоретическая биология. — М.–Л.: ВИЭМ, 1935. — 205 с.
10. *Карасев В.А.* О возможных функциях биологических молекул в составе систем сопряженных ионно-водородных связей // Ж. общ. биол. 1978. Т. 39. С. 76–85.
11. *Karasev V.A.*, *Stefanov V.E.* Chemical Organization of Supramolecular Biostructures: Realization of Principle Continuity and Conjugation through Hydrogen Bond in the Zone-Block Model of Biomembranes // J. Biochem. Organiz. 1992. V. 1. P. 71–87.
12. *Карасев В.А.*, *Стефанов В.Е.*, *Курганов Б.И.* Надмолекулярные биоструктуры: организация, функционирование, происхождение // В кн.: Итоги науки и техники, сер. Биол. химия. 1989. Т. 31. — М.: ВИНИТИ. — 199 с.
13. *Фундаменский В.С.*, *Карасев В.А.*, *Лучинин В.В.* Физическая реконструкция зонно-блочной модели биомембран. I. Молекулярная и кристаллическая структура изобутил-2-аминоэтилфосфата — аналога фосфатидилэтаноламина // Биол. мембр. 1992. Т. 9. С. 789–802.
14. *Tsukihara T.*, *Aoyama H.*, *Yamashita E.*, *Tomizaki T.*, *Yamagichi H.*, *Shinzava-Itoh K.*, *Nakashima R.*, *Yaono R.*, *Yoshikawa S.* The whole structure of the 13-subunit oxidized cytochrome c oxidase at 2.8 Å // Science. 1996. V. 272. P. 1136–1144.
15. *Grigorieff N.*, *Ceska T.A.*, *Downing K.H.*, *Baldwin J.M.*, *Henderson R.* Electron-crystallographic refinement of the structure of bacteriorhodopsin // J. Mol. Biol. 1996. V. 259. P. 393–421.
16. *Zhang Z.*, *Huang L.*, *Shuleister V.M.*, *Chi Y.I.*, *Kim K.K.*, *Hung L.W.*, *Crofts A.R.*, *Berry E.A.*, *Kim S.H.* Electron transfer by domain movement in cytochrome bc1 // Nature. 1998. V. 392. P. 677–684.
17. *Pascher I.*, *Lundmark M.*, *Nyholm P.-G.*, *Sundell S.* Crystal structures of membrane lipids // Biochim. Biophys. Acta. 1992. V. 1113. P. 339–373.
18. *Mouritsen O.G.*, *Andersen O.S.* (Eds). In search of a new biomembrane model. (Материалы симпозиума) Dan. Vid. Selsk. Biol. Skr. 1998. V. 49. P. 1–224.

19. *Фундаменский В.С.*, *Баннова И.И.*, *Карасев В.А.*, *Мирошкин В.П.*, *Лучинин В.В.* Физическая реконструкция зонно-блочной модели биомембран. II. Структура и электрофизические свойства изобутил-2-аминоэтилфосфата гидрохлорида // Биол. мембр. 1995. Т. 12. С. 524–538.
20. *Фундаменский В.С.*, *Баннова И.И.*, *Франке В.Д.*, *Карасев В.А.*, *Коровникова Н.А.*, *Лучинин В.В.* Физическая реконструкция зонно-блочной модели биомембран. III. Синтез и изучение структуры изобутил-2-(триметиламмонио) этилфосфата — аналога фосфатидилхолина в кристаллах его моногидрата и комплекса моногидрата с изобутанолом // Биол. мембр. 1997. Т. 14. С. 109–124.
21. *Karasev V.A.*, *Korovnikova N.A.*, *Miroshkin V.P.*, *Luchinin V.V.*, *Fundamensky V.S.*, *Bannova I.I.*, *Stefanov V.E.* Crystals of phospholipids analogues as plausible material for molecular electronics. I. Synthesis and investigation of structure and physical properties of two halogen hydride derivatives of isobutyl-2-aminoethyl phosphate — phosphatidylethanolamine analogues // Adv. Mater. Opt. Electron. 1996. V. 6. P. 1–14.
22. *Karasev V.A.*, *Fundamensky V.S.*, *Bannova I.I.*, *Franke V.D.*, *Stefanov V.E.* Crystallization of the isobuthylphosphocholine-cholesterol-isobutanol (1:3:3) complex and its investigation by X-ray analysis: interaction of phospholipid headgroups with cholesterol // Biochim. Biophys. Acta. 2000. V. 1166. P. 23–38.
23. *Gorter T.*, *Grendel F.* On bimolecular layer of lipids on the chromocytes of blood // J. Exp. Med. 1925. V. 41. P. 439–443.
24. *Danielli J.F.*, *Davson H.A.* A contribution of the theory of permeability of thin film // J. Cell. Comp. Physiol. 1935. V. 5. P. 495–508.
25. *Robertson J.D.* Granulo-fibrillar and globular substructure in unit membranes // Ann. N.Y. Acad. Sci. 1966. V. 137. P. 421–440.
26. *Raynolds J.A.*, *Trayer H.* Solubility of membrane proteins in aqueous media // J. Biol. Chem. 1971. V. 246. P. 7337–7342.
27. *Benson A.A.* On the orientation of lipids in chloroplasts and cell membranes // J. Am. Oil Chemist's Soc. 1966. V. 43. P. 265–270.
28. *Benedetti E.*, *Emmelot P.* Electron microscopic observations on negatively stained plasma membranes isolated from rat liver // J. Cell Biol. 1965. V. 26. P. 299–305.
29. *Sjöstrand F.S.* A new ultrastructural elements of membranes in mitochondria and some cytoplasmic membranes // J. Ultrastruct. Res. 1963. V. 9. P. 340–361.
30. *Lucy J.A.* Globular lipid micelles and cell membranes // J. Theor. Biol. 1964. V. 7. P. 360–373.
31. *Green D.E.*, *Perdue J.F.* Correlation of mitochondrial structure and function // Ann. N.Y. Acad. Sci. 1966. V. 137. P. 667–684.
32. *Волков Е.И.*, *Чернавский Д.С.* Биологические следствия физической организации плазматических мембран нормальных и опухолевых клеток // Изв. АН СССР. Сер. биол. 1981. № 1. С. 29–43.
33. *Mikelsaar R.* A hypothesis on the structure of the biomembrane lipid bilayer // Mol. Cryst. Liq. Cryst. 1987. V. 152. P. 229–257.
34. *Полторак О.М.* Адсорбционное моделирование биомембран и ферментных комплексов // Ж. физ. химии. 1967. Т. 41. С. 2544–2562.
35. *Бенько Е.М.*, *Камышный А.Л.*, *Чухрай Е.С.* Исследование адсорбционных слоев лецитина и холестерина на аэросиле методом ИК-спектроскопии // Биофизика. 1976. Т. 21. С. 992–996.
36. *Tsukihara T.*, *Shimokata K.*, *Katayama Y.*, *Shimada H.*, *Muramoto K.*, *Aoyama H.*, *Mochizuki M.*, *Shinzawa-Itoh K.*, *Yamashita E.*, *Yao M.*, *Ishimura Y.*, *Yoshikawa S.* The low-spin heme of cytochrome c oxidase as the driving element of the proton-pumping process // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 2003. V. 100. P. 15304–15309.

37. *Svensson-Ek M.*, *Abramson J.*, *Larsson G.*, *Tornroth S.*, *Brezezinski P.*, *Iwata S.* The X-ray crystal structures of wild-type and EQ(I-286) mutant cytochrome c oxidases from Rhodobacter sphaeroides // J. Mol. Biol. 2002. V. 321. P. 329–339.
38. *Marsh D.*, *Pali T.* The protein-lipid interface: perspectives from magnetic resonance and crystal structures // Biochim. Biophys. Acta. 2004. V. 1666. P. 118–141.
39. *Lange C.*, *Nett J.H.*, *Trumpower B.L.*, *Hunte C.* Specific roles of protein–phospholipid interactions in the yeast cytochrome bc_1 complex structure // УМВО J. 2001. V. 20. P. 6591–6600.
40. *Henderson R.*, *Unwin P.N.T.* Three-dimensional model of purple membrane obtained by electon microscopy // Nature. 1975. V. 257. P. 29–32.
41. *Unwin P.N.T.*, *Henderson R.* Molecular structure determination by electron microscopy of unstained crystalline specimens // J. Mol. Biol. 1975. V. 94. P. 425–440.
42. *Henderson R.*, *Baldwin J.M.*, *Ceska T.A.*, *Zemlin F.*, *Beckmann E.*, *Downing K.H.* Model for the structure of bacteriorhodopsin based on high-resolution electron cryo-microscopy // J. Mol. Biol. 1990. V. 213. P. 899–929.
43. *Скулачев В.П.* Энергетика биологических мембран. — М.: Наука, 1989. — 564 с.
44. *Levy D.*, *Chami M.*, *Rigaud J.L.* Two-dimensional crystallization of membrane proteins: the lipid layer strategy // FEBS Lett. 2001. V. 504. P. 187–193.
45. *Rigaud J.L.* Membrane proteins: functional and structural studies using reconstituted proteoliposomes and 2-D crystals // Braz. J. Med. Biol. Res. 2002. V. 35. P. 753–766.
46. *Hasler L.*, *Heymann J.B.*, *Engel A.*, *Kistler J.*, *Walz T.* 2D crystallization of membrane proteins: rationales and examples // J. Struct. Biol. 1998. V. 121. P. 162–171.
47. *Warne A.*, *Wang D.N.*, *Saraste M.* Purification and two-dimensional crystallization of bacterial cytochrome oxidases // Eur. J. Biochem. 1995. V. 234. P. 443–451.
48. *Pascher I.*, *Lundmark M.*, *Nyholm P.-G.*, *Sundell S.* Crystal structures of membrane lipids // Bioch. Biophys. Acta. 1992. V. 1113. P. 271–430.
49. *Hirt R.H.*, *Berchtold R.* Zur Synthese der Phosphatide. Eine neue Synthese der Kephaline // Helv. chim. Acta. 1957. V. 40. P. 1928–1932.
50. *Karasev V.A.*, *Korovnikova N.A.*, *Gindin V.A.*, *Stefanov V.E.* Synthesis and NMR identification of isobutyl analogs of phospholipids designed for the modeling of biomembrane fragments // Colloid ana Surfaces. A. Physicochemical and Engineering Aspects. 1996. V. 115. P. 83–87.
51. *Eibl H.* Phospholipid synthesis: Oxazaphospholanes and dioxaphospholanes as intermediates // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1978. V. 75. P. 4074–4077.
52. *Magolda R.L.*, *Johnson P.R.* A new efficient and versatile synthesis of alkyl phosphorylcholines // Tetrahedron Lett. 1985. V. 26. P. 1167–1170.
53. *Hauser H.*, *Pascher I.*, *Sundell S.* Conformation of phospholipids. Crystal structure of a lysophosphatidylcholine analogue // J. Mol. Biol. 1980. V. 137. P. 249–264.
54. *Преображенский А.А.*, *Бишард Е.Г.* Магнитные материалы и элементы. — М.: Высшая школа, 1986. — 352 с.
55. Справочник по электротехническим материалам. Т. 3., разд. 22. — М.: Энергоатомиздат, 1988. — 726 с.
56. Диэлектрическая спектроскопия / Ред. Г. А. Смоленский. — М.: Изд. Иностр. лит., 1960. — 363 с.
57. *Пасынков В.В.*, *Сорокин В.С.* Материалы электронной техники. — М.: Высшая школа, 1986. — 367 с.
58. *Пасынков В.В.*, *Чиркин Л.К.* Полупроводниковые приборы. — М.: Высшая школа, 1987. — 431 с.
59. Molecular Electronics: Science and Technology / Eds: A. Aviram, M. Ratner // Ann. — N.Y.: Acad. Sci. 1998. V. 852.

60. Conjugated Oligomers, Polynmers and Dendrimeres: From Polyacetylene to DNA / Ed: J.-L. Brédas. — Brussels: De Boeck Université, 1999. — 632 p.
61. *Szent-Györgyi A.* Towards a new biochemistry? // Science. 1941. V. 93. P. 609–611.
62. *Gutmann F.*, *Lyons L.E.* Organic Semiconductors. — N. Y.: Wiley, 1967. — 858 p.
63. *Cardew M.H.*, *Eley D.D.* The semiconductivity of organic substances. Part 3. Haemoglobin and some amino acids // Discuss. Faraday Soc. 1959. V. 27. P. 115–128.
64. *Aftergut S.*, *Brown G.P.* Electronic properties of organic compounds. I. Heterocyclic compounds // In: Organic Semiconductors / Ed. by J.J. Brophy, J.W. Butterly. — N. Y.: Macmillan, 1962. P. 79–88.
65. *Burnel M.E.*, *Eley D.O.* Subramanyan*V.* Semiconduction in nucleic acid and its components // Ann. N. Y. Acad. Sci. 1969. V. 158. P. 191–209.
66. Mc Pollock J., Ubellohde A.R. Conductance mechanisms in crystals containing hydrogen bonds // Trans. Faraday Soc. 1956. V. 52. P. 1112–1116.
67. *Evarestov R.A.*, *Stefanov V.E.*, *Karasev V.A.*, *Bandura A.V.* Quantum chemical calculations of crystalline model of biomembrane // Int. J. Quant. Chem. 2004. V. 96. P. 106–115.
68. *Gale J.* General Utility Lattice Program Version 1.2 User's Manual. — London: London Imperial College, 1998.
69. *Doversi R.*, *Saunders V.R.*, *Roetti C.*, *Causa M.*, *Harrison N.M.*, *Orlando R.*, *Apra E.* Crystal 95 User Manual. — Torino: Torino University, 1996.
70. *Физер Л.*, *Физер М.* Стероиды / Пер. с англ. — М.: Мир, 1964. — 982 с.
71. *Demel R.A.*, *de Kruiff B.* The function of sterols in membranes // Biochim. Biophys. Acta. 1976. V. 457. P. 109–132.
72. *Кренс Е.М.* Липиды клеточных мембран. Эволюция липидов мозга. Адаптационная функция липидов. — М.: Наука, 1981. — 339 с.
73. *Benga G.*, *Holmes R.P.* Interactions between components in biological membranes and their implications for membrane function // Progr. Biophys. Molec. Biol. 1984. V. 43. P. 195–257.
74. *Yeagle P.L.* Cholesterol and the cell membrane // Biochim. Biophys. Acta. 1985. V. 822. P. 267–287.
75. *Craven B.M.* Cholesterol crystal structures: adducts and esters // In: Handbook of Lipid research. V. 4. The Physical Chemistry of lipids / Ed. D.M. Small. — N. Y.–London: Plenum Press, 1988. P. 149–182.
76. *Urbina J.A.*, *Pekerar S.* Le H.-b., Patterson J., Montez B., Oldfield E. Molecular order and dynamics of phosphatidylcholine bilayer membranes in the presence of cholesterol, ergosterol and lanosterol: a comparative study using 2H-, 13C- and 31P-NMR spectroscopy // Biochim. Biophys. Acta. 1995. V. 1238. P. 163–176.
77. *Presti F.T.* The role of cholesterol in membrane fluidity // In: Membrane Fluidity in Biology. V. 4. Cellular Aspects / Ed. by R.C. Aloia, J.M. Boggs. — Orlando- San Diego-etc.: Academic Press, 1985. P. 97–147.
78. *Luciano L.*, *Reale E.*, *Konitz H.*, *Boseck U.*, *Boseck S.* Alignment of cholesterol in the membrane bilayer // J. Histochem. Cytochem. 1989. V. 37. P. 1421–1425.
79. *Pascher I.*, *Sundell S.*, *Eibl H.*, *Karlos K.* The single-crystal structure of octadecyl-2-methyl-glycerophosphocholine monohydrate–a multilamellar structure with interdigitating head groups and hydrocarbon chains // Chem. Phys. Lipids. 1986. V. 39. P. 53–64.

Глава 12

ХЕМОСЕНСОРНЫЕ СТРУКТУРЫ

Молекулярные мембраны интересны не только сами по себе, но и тем, что могут стать основой систем более высокого порядка, например, клеток. Клеточные системы, в свою очередь, могут составлять отдельные ткани и формировать органы еще более высокоорганизованных систем, какими в биологии являются растения и животные. Клеточные системы должны поддерживать внутренний гомеостаз внутри себя и осуществлять обмен информацией с другими клетками. В то же время, для обеспечения устойчивого состояния целостных систем высокого уровня также должен происходить обмен информацией, влияющей на состояние органов систем. Во многих случаях такой обмен происходит с помощью химических молекул, выполняющих роль «сигналов». Восприятие химических сигналов осуществляют многочисленные белки и комплексы белков с другими молекулами, входящими в структуру мембран и нуклеопротеидов. Такие белки и комплексы обычно называют хемосенсорными. На молекулярном уровне эти структуры можно анализировать с двух сторон. С одной стороны, можно проводить анализ особенностей самого процесса хеморецепции, который по степени сложности даже уступает процессу катализа. С другой стороны, если учесть, что хемосенсоры должны работать в системе регуляции функциональной активности клеточных систем, то анализ их работы даже сложнее, чем работа, например, самих мембран. Добавим также, что некоторые сенсоры связаны не с мембранами, а с ядром. По этой причине главу, посвященную модели хемосенсоров на основе ССИВС и анализу современных данных и представлений в биосенсорике, мы расположили после модели мембранных структур. План изложения материала, однако, аналогичен предыдущим главам. Сначала будет изложена модель хемосенсорики, развитая на основе концепции ССИВС, затем будет проведен анализ современной литературы по проблемам биосенсорики и, наконец, в конце эти данные будут сопоставлены с выводами, вытекающими из нашей модели.

12.1. Принципы конструирования хемосенсоров на основе концепции ССИВС

12.1.1. Идея сенсора, заложенная в концепции ССИВС. В рамках развития концепции ССИВС нами была предложена идея молекулярного хемосенсора (далее мы будем для краткости называть его «сенсором») [1, 2]. Она состоит в том, что сенсор должен содержать ССИВС, к которой присоединен донор заряда (D^1) и акцептор заряда (A^1), причем некоторые из групп ССИВС принадлежит не самой структуре, а внешней молекуле, называемой лигандом. Предполагается, что донорами зарядов служат молекулы трифосфатов (АТФ, ГТФ), распад которых будет обеспечивать появление избыточного заряда, а акцепторами зарядов являются белки, находящиеся

на определенном расстоянии от молекулы сенсора. При этом сенсор осуществляет регуляцию функциональной активности этих белков. Рассмотрим схему (схема 12.1, *а*):

$$\begin{array}{l} HD^1 \rightarrow HQ_1\text{–}R\text{=}X_1 \ldots HQ_2\text{–}R\text{=}X_2 \ldots HQ_i\text{–}R\text{=}X_i \ldots HQ_n\text{–}R\text{=}X_n \ldots . \rightarrow HA^1 \quad а \\ \qquad\qquad\qquad\qquad\qquad\qquad\qquad\qquad\quad | \\ \qquad\qquad\qquad\qquad\qquad\qquad\qquad\qquad\quad Z_1 \\ HD^1 \ldots . HQ_1\text{–}R\text{=}X_1 \ldots HQ_2\text{–}R\text{=}X_2 \ldots \qquad\qquad \ldots HQ_n\text{–}R\text{=}X_n \ldots . \quad HA^1 \quad б \end{array} \qquad (12.1)$$

Предположим, что группа HQ_i–R=X_i в этой ССИВС принадлежит не самой структуре сенсора, а какой-либо простой молекуле Z_1. Тогда в ее отсутствии ССИВС оказывается разомкнутой и сигнал от донора к акцептору пройти не сможет. Таким образом, с позиции концепции ССИВС, сенсор — это такая структура, в которой содержится ССИВС, способная замыкаться группами, принадлежащими молекулам лигандов. Это могут быть как относительно простые молекулы, например, медиаторы, так достаточно сложные, вплоть до белковых, типа инсулина. Однако суть остается одна и та же: эти лиганды осуществляют замыкание ССИВС, что обеспечивает прохождение сигнала от донора к акцептору. Таким образом, идея молекулярного узнавания заложена в **принципе непрерывности ССИВС**, который нарушается при отсутствии лиганда и восстанавливается с его появлением.

Применим к какому-либо медиатору, например, гистамину, системный анализ, аналогичный проведенному в гл. 6. Такой анализ впервые был проведен нами в работах [1, 2]. Как видно на рис. 12.1, структура гистамина имеет две четко разграниченных области, способных участвовать в формировании ССИВС: область аминогруппы («хвостик») и область имидазольного кольца («головка»).

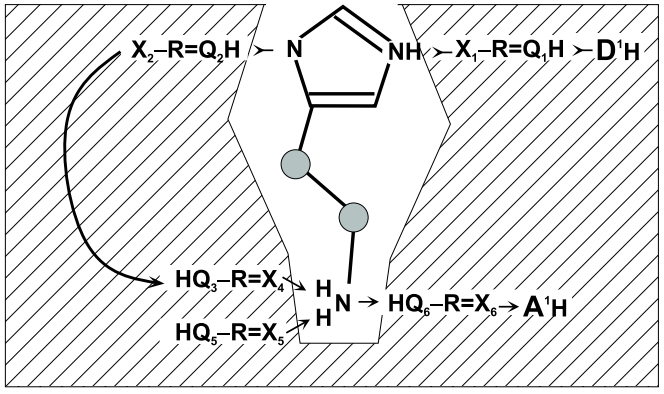


Рис. 12.1. Анализ аминомедиатора гистамина в составе ССИВС рецептора

Имидазольное кольцо, подобно гистидину (см. раздел 6.2.2), имеет один вход — один выход и может замыкать ССИВС в области зоны I, тогда как хвостик замыкает две или три ССИВС (зона II). В присутствии медиатора сигнал от донора D^1 через группы HQ_1–R=X_1… HN–C=N… HQ_2–R=X_2 зоны I направляется к группе HQ_3–R=X_3… HN… HQ_4–R=X_4… и далее к акцептору HA^1 зоны II. Следует отметить, что принципиально сходное строение имеют и другие аминомедиаторы — гамма-аминомасляная кислота, адреналин, серотонин (5-окситриптамин) и другие [3]. Это означает, что все они своими «хвостиками» должны замыкать ССИВС в области,

аналогичной зоне II, а специфичность действия им придают «головки» зоны I. Первоначально предполагалось [1, 2], что обе зоны не связяаны между собой. В работе [4] был предложен вариант, в котором «головка» и «хвостик» входят в структуру единой ССИВС (рис. 12.1.).

12.1.2. Модель сенсора, учитывающая механизм переноса зарядов по ССИВС. Развитие модели связано с учетом механизма переноса зарядов по ССИВС. Как мы показали в разделе 5.2, модель переноса зарядов по ССИВС использует оба направления, вследствие чего структуры на их основе должны состоять по крайне мере из двух симметричных субструкур. В работах [4, 5] была предложена модель работы сенсора, учитывающая эти требования (рис. 12.2).

Допустим, что в димерной структуре, содержится ССИВС, состоящая из двух участков — донорного, связанного с донором HD^1, и акцепторного — с присоединенным акцептором A^1H (рис. 3, *а*), расположенных в двух различных субъединицах. Предположим, далее, что группа HQ_i–R=X_i на донорном участке принадлежит не структуре, а молекуле лиганда Z_1. Тогда, в случае отсутствия второй молекулы Z_2ССИВС оказывается разомкнутой и перенос зарядов по возможен лишь до группы HX_n'-R=Q_n' (рис. 12.3, *а*). Появление группы HX_i–R=Q_i молекулы Z_2 в этом участке обеспечивает возможность замыкания ССИВС и переноса заряда к молекуле акцептора A^1H (рис. 3, *б*). Это сопровождающегося изменением степени сродства к ССИВС как молекулы донора D^1H, так и молекул лиганда Z_1 (рис. 3, *б*). Обе эти молекулы покидают свои участки, причем D^1H заменяется на молекулу акцептора A^2H. На следующей стадии (рис. 3, *в*) молекула акцептора A^1H^+ покидает структуру и заменяется на молекулу донора HD^2. Далее, на четвертой стадии (рис. 3 *г*), симметричной первой, процесс переноса заряда идет в противоположном направлении от D^2 к A^2, в результате чего димер переходит в состояние, показанное на рис. 3 *е*. Последующая замена доноров и акцепторов приводит к состоянию 3, *а* и цикл повторяется.

Таким образом, процесс рецепции, исходя из нашей модели, связан с замыканием ССИВС группами, принадлежащими лиганду, не претерпевающими химических превращений, с последующим переносом по этим системам зарядов, совершаемым попеременно, как минимум, в двух субъединицах. Процесс рецепции в этом случае очень близок механизму аллостерической регуляции ферментов, предложенному в модели катализа олигомерными ферментами (раздел 10.1.3.). Следствиями данной модели являются:

— олигомерная организация сенсорных структур;

— наличие парных мест связывания доноров и акцепторов зарядов (например, молекул АТФ);

— попеременное функционирование рецепторных, а также донорных и акцепторных участков связывания.

Последнее следствие должно проявляться как отрицательная кооперативность в кинетике функционирования рецепторных структур и в виде наличия двух типов участков связывания — с сильным и слабым сродством к субстратам и источникам зарядов.

Прежде чем внедряться в детали достаточно сложного мира биорецепторов необходимо обрисовать общую картину того, какие бывают сенсоры и каковы современные данные об их структуре. По мере их изложения мы будем рассматривать те

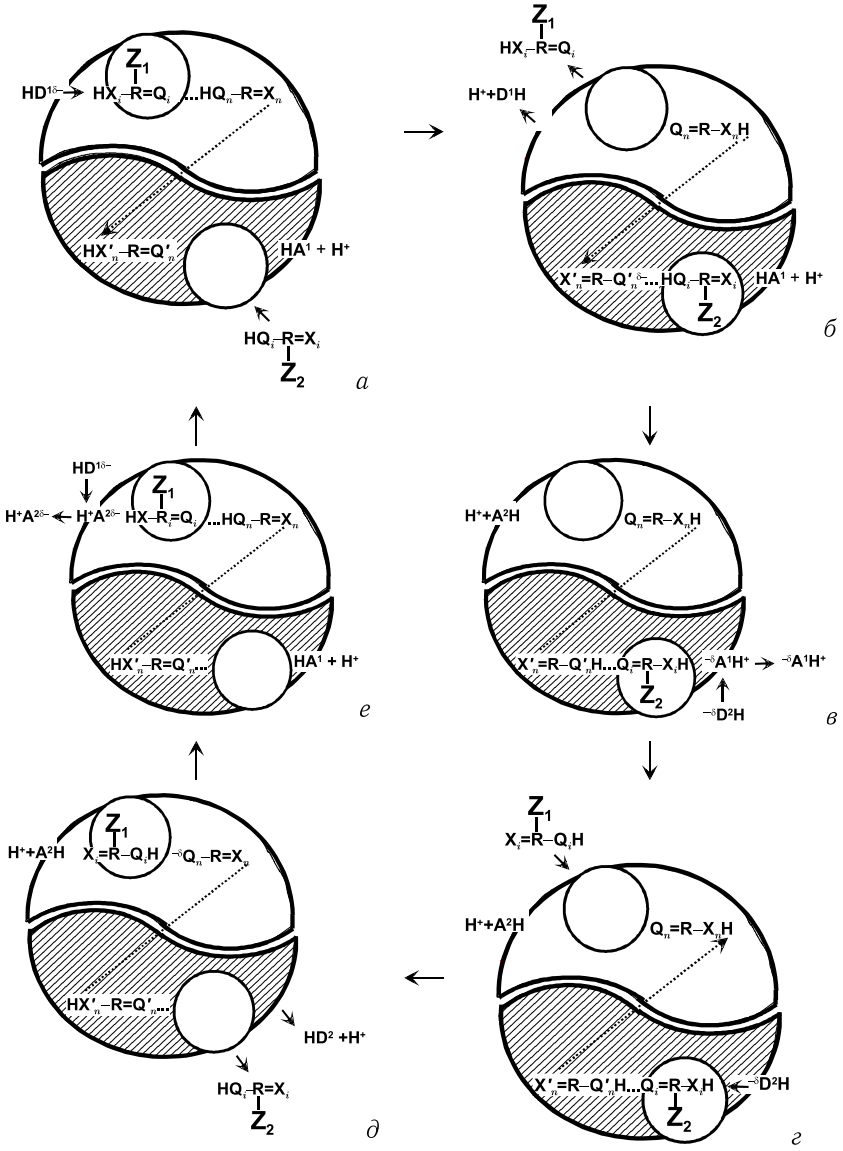


Рис. 12.2. Модель работы сенсора, состоящего из двух субъединиц, учитывающая механизм переноса зарядов по ССИВС

или иные структуры более подробно, с тем, чтобы сопоставить известные данные с описанными выше представлениями.

Хеморецепторы (далее — рецепторы), т. е. биоструктуры, узнающие химические молекулы («сигналы»), широко распространены в биологических системах. Они представлены в виде различных комплексов, в частности, мембранных и нуклеопротеидных. Классифицировать эти структуры можно по-разному, в зависимости от

целей. Мы будем использовать классификацию, основанную на их функциональном назначении.

По своему назначению рецепторы можно подразделить на: а) межсистемные рецепторы, обеспечивающие обмен информацией между отдельными организмами (биосистемами); б) внутрисистемные рецепторы, связанные с регуляцией внутреннего состояния самих биосистем; в) внутриклеточные рецепторы, участвующие в регуляции состояния внутри клеток. Эта классификация, конечно, весьма условна. Например, если рассматривать в качестве целостной системы биоценоз, то рецепторы группы а) переходят в разряд группы б). Однако для большего упорядочивания наших знаний такое подразделение достаточно удобно.

12.2. Межсистемные рецепторы

12.2.1. Рецепторы микроорганизмов. На уровне микроорганизмов численность их популяции регулируется разнообразными биологически активными веществами и, в частности, антибиотиками. Изучение рецепторов антибиотиков представляет большую сложность, так как по большей части они интегрированы в мембраны бактерий. Тем не менее, для некоторых из них удалось достичь определенного успеха. Так из наружной мембраны бактерии E. coli выделен и исследован методом РСА белок FhuA (файл 1qjq), участвующий в переносе через мембрану антибиотика альбомицина [6]. Согласно авторам, это один из первых белков, связывающих антибиотики, изученных методом РСА. Приводим структуру этого комплекса (рис. 12.3, *а*, *б*). На рисунке видно, что молекула антибиотика практически не проникает вглубь белка (рис. 12.3, *а*). При этом ряд функциональных групп антибиотика образует водородные связи с полярными группами аминокислот белка. На рис. 12.3, *б* они заключены в прямоугольники. Большая часть групп антибиотика и связывающих его аминокислот формируют единые непрерывные ССИВС. Мы не приводим их структуру из-за низкого разрешения (2,9 Å), что снижает степень достоверности этих данных.

Сравнительно недавно появилось представление об обмене информацией внутри популяций и между популяциями микроорганизмов за счет химических сигналов, так называемый «quorum sensing» [7–11]. Этот механизм действует через регуляцию генной активности микробов и предназначен для поддержания в интактном состоянии бактериальных колоний («биопленок» - «biofilms»). Молекулы, участвующие в этом процессе, носят название автоиндукторы (autoinducers). Они вызывают разнообразные адаптивные изменения в состоянии микробов, такие как биолюминецнцию, синтез антибиотиков и активацию формирования биопленок. К ним относятся такие соединения как γ-бутиролактоны и авто-индуцирующие пептиды у Грам-положительных бактерий, и N-ацилгомосерин лактоны, хиноны и циклические дипептиды у Грам-отрицательных бактерий. В мембранах бактерий для этих соединений, очевидно, существуют рецепторные комплексы. Так, группа японских авторов смогла выделить, получить в кристаллическом виде и изучить методом РСА белок, являющийся рецептором γ-бутиролактона в штамме бактерий Streptomyces coelicolor A3(2) (файлы 1u15, 1u16) [12]. Структура 1u16 не содержит лиганда, а структура 1u15 — с аналогами лиганда (метилселеном и β-аминобутанолом-1). В структуре димера, как видно на рис. 12.3 *в*, находится по четыре пары аналогов. Все они в той или иной степени встраиваются в структуру ССИВС белка (рис. 12.3 *г*), которые частично

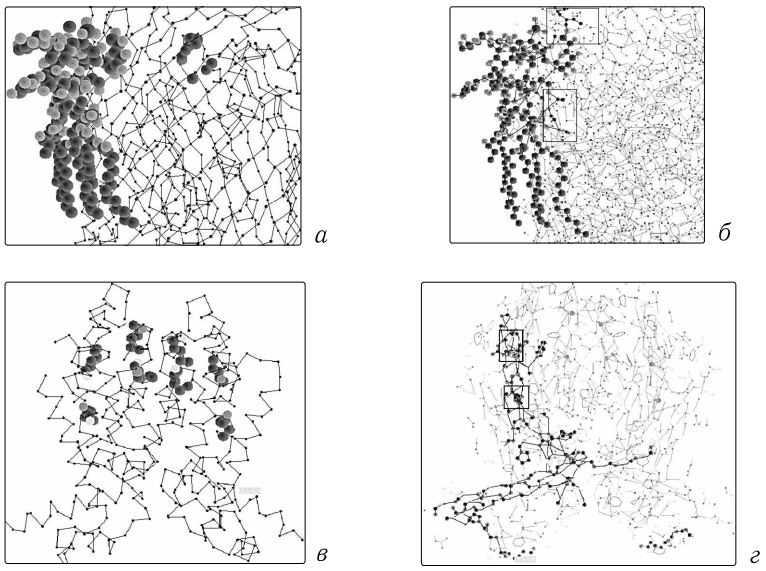


Рис. 12.3. Структура комплекса антибиотика альбомицина с белком-переносчиком белок FhuA — (файл 1qjq) (*а*, *б*) и комплекса аналога гамма-бутиролактона с авторегуляторным белковым рецептором из Streptomyces coelicolor A3(2) (файл 1u15 [12]) (*в*, *г*): *а*, *в* — структура белков в виде α-углеродных атомов; *б*, *г* — в виде ССИВС

переходят в соседнюю субъединицу. К сожалению, то, что это лишь аналоги, не позволяет сделать достоверные выводы о структуре ССИВС, окружающих сами молекулы бутиролактонов. Можно лишь предполагать, что часть ССИВС аналогична приведенным на рис. 12.3, *г*. В настоящее время данный механизм информационного обмена, широко распространенный в различных группах бактерий, активно изучается [13–17].

У многоклеточных организмов, а именно, среди животных, обмен информацией существенно усложняется. Появляются органы зрения и слуха, воспринимающие световые и звуковые сигналы. В отличие от одноклеточных организмов, химические сигналы у животных являются лишь одним из способов передачи информации, притом не самым главным. Химические сигналы, переносимые через воздушную среду, детектируются с помощью органов обоняния, содержащих обонятельные рецепторы, а через водную среду — с помощью органов вкуса, в которых располагаются вкусовые рецепторы.

12.2.2. Обонятельные и вкусовые рецепторы. Обоняние у животных используется как в процессе поиска пищи, так и для поиска половых партнеров. Органы обоняния насекомых обычно расположены в антеннах (усиках), а у позвоночных — в носу. Эти органы имеют довольно сложную анатомическую микроструктуру, в детали которой мы вдаваться не будем. Современные данные (см. обзоры [18–22]) показывают, что как у насекомых, так и у позвоночных животных, например у млекопитающих, встречается несколько групп белков, участвующих в распознавании запахов.

Одорант-связывающие белки. Первыми белками, с которыми, по-видимому, встречаются химические вещества, попадающие из воздуха, являются одорант-

связывающие белки (ОСБ) слизистой оболочки носа позвоночных. Они являются водорастворимыми и, связываясь с гидрфобными молекулами, попадающими в водное окружение, усиливают его доставку к рецепторным белкам. Установлено, что эти белки относятся к семейству липокалинов. К настоящему времени изучены структуры ОСБ быка и свиньи [23–27]. Известны также ОСБ насекомых [28]. Принципиальная схема структуры этих белков показана на рис. 12.4 [20]. Как видно на схеме, эти белки представляют собой циклическую β-структуру, в центре которой находится полость, куда попадают молекулы химических веществ.

Анализ изученных структур с помощью программы Protein 3D позволил выявить три типа структур, содержащих молекулы химических веществ. Первый тип содержит структуры, в которых, как правило, соединения либо не связаны с белком, либо связаны лишь с одной группой белка. К ним относятся структуры 1dzj (2-амино-4-бутил-5-пропилселеназол), 1dzm (сложный эфир бензойной кислоты и фенилметила), 1dzp (дифенилметенон), 1e00 (2,6-диметил-7-октен-2-ол), 1e06 (5-метил-2–(1-метилэтил) фенол) свиньи и 1gt4 (ундеканал), 1gt5 (бензофенон), 1pbo (селеносодержащий одорант) быка. Второй тип белков содержит молекулы, связанные с протяженными,

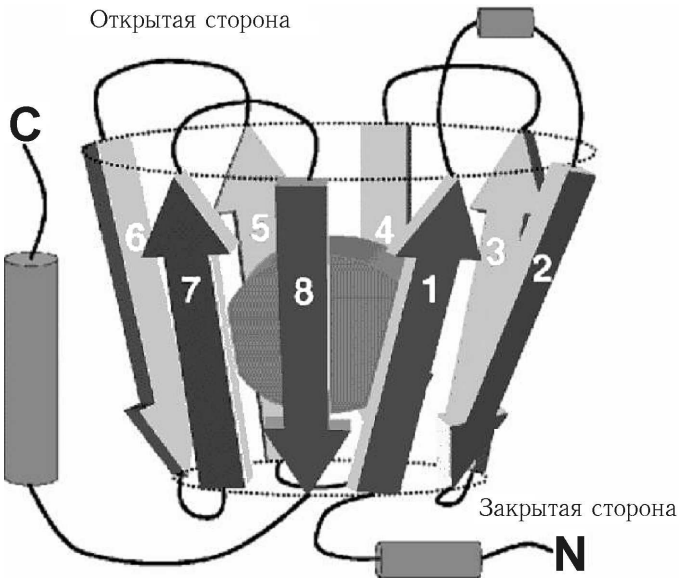


Рис. 12.4. Общая структура одорант-связывающих белков (по [20])

но симметричными ССИВС — это структура 1dzk (пиразина-2-изобутил-3-метоксипиразин) свиньи. Наконец, третью группу составляют молекулы с асимметричными субъединицами, одна из которых содержит молекулу лиганда, связанную с ССИВС, а другая — не связанную ни с какими группами или связанную с ССИВС, частично отличающейся от первой субъединицы — структура 1e02 (ундеканал) свиньи, 1gt1 (аминоантрацен и пиразин), 1gt3 (дигидромирценол) быка.

В качестве примера рассмотрим структуру одорант-связывающего белка свиньи [27], визуализированную программой Protein 3D (рис. 12.5, *а–в*). На рис. 12.5, *а* видно, что в обеих субъединицах находится по одному лиганду. В А субъединице

этот лиганд связан с ССИВС белка (рис. 12.5, *б*). Эта связь, как видно на рис. 12.5, *в*, осуществляется через HN–C=O-группу Asn 102A, который, в свою очередь связан с фрагментом β-структуры. Для сравнения, на рис. 12.5 *г* показана в виде ССИВС структура одорант-связывающего белка быка, изученного теми же авторами в работе [26]. Видно, что молекулы ундеканала в этом белке не связаны с ССИВС. Тот факт, что две близкие структуры белков, содержащие сходную молекулу (ундеканал),

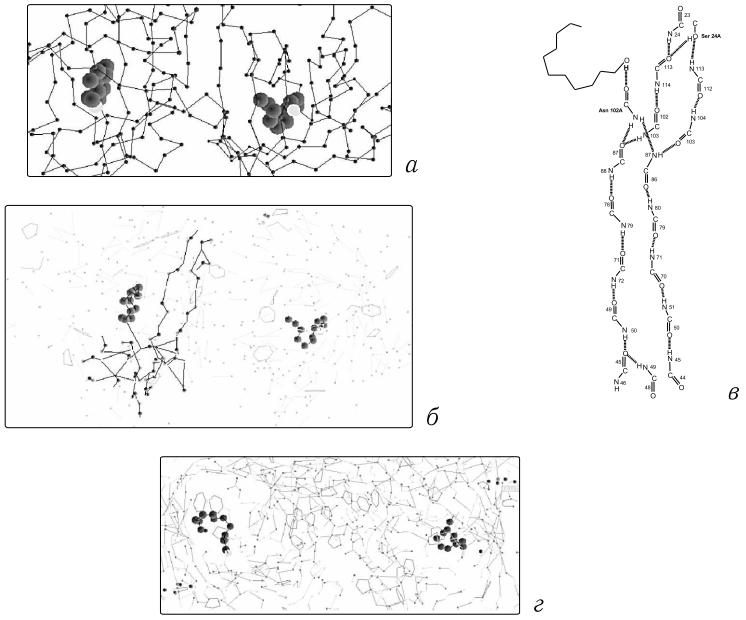


Рис. 12.5. Структура одорант-связывающего белков: свиньи, файл 1e02 (*а–в*) и быка, файл 1gt4 (*г*); оба белка содержат лиганд ундеканал: *а* — в виде α-углеродного скелета; *б* и *г* — в виде ССИВС; *в* — схема ССИВС, связанных с лигандом в белке 1e02

имеют различную степень связи с ССИВС свидетельствует, по-видимому, о том, мы имеем дело со структурами, находящимися в разных функциональных состояниях.

Феромон-связывающие белки. В жизни животных, в первую очередь насекомых, важную роль играют феромоны, вещества липидной природы (жирные спирты и другие аналогичные соединения), выделяемые половыми органами самок для привлечения самцов. В обонятельных органах усиков (антенн) насекомых найдены высокоспецифичные рецепторы, локализованные в мембранах нейронных клеток, основными компонентами которых являются являются феромон-связывающие белки (ФСБ). Одним из первых была изучена структура комплекса феромона бомбикола ((E,Z)-10,12-гексадецен-1-ола) с ФСБ тутового шелкопряда [28] (файл 1dqe, рис. 12.6, *а–в*). Как следует из рис. 12.6, *а*, молекула феромона расположена в полости и окружена четырьмя антипараллельными α-спиралями. Неполярная часть молекулы феромона контактирует с неполярными остатками белка. В то же время, его C–OH-группа связывается в A-субъединице с Ser 56 (рис. 12.6, *б*). В свою очередь, C–OH-группа Ser 56 образует водородную связь с ССИВС, состоящей из HN–C=O-групп одного из спиральных фрагментов, с которым связаны дисульфидная

группа, Arg 48 и Asp 106. Близкая, но не вполне идентичная, структура наблюдается во второй субъединице.

В настоящее время изучены феромон-связывающие белки и других насекомых — дрозофилы (1oof, 1oog, 1ooh), таракана (1org, 1ow4, 1p28) и пчелы (1r5r) [28–31]. За исключением 1r5r, эти белки выделены в виде димеров. При этом структура ССИВС, с которой связываются лиганды, в обеих субъединицах, как правило, похожа, но не идентична. Феромон-связывающие белки обнаружены и у позвоночных животных. Рецепторы у них находятся в клетках сошниково-носового органа, расположенного в носовой полости. Известна, в частности, структура феромон-связывающих белков крысы (2a2g, 2a2u) и мыши (1map).

Хемосенсорные белки. Третью группу белков, обнаруженных в органах обоняния, образуют хемосенсорные белки [32]. По своим функциям они близки к ОСБ, но отличаются от них укладкой α-спиральных фрагментов. Примером может служить структура хемосенсорного белка, недавно выделенного из антенн капустницы (Mamestra brassicae) [33]. Эта структура также выделена и изучена в виде димера (1n8v). Каждая из субъединиц, структурно отличающихся друг от друга, содержит по три молекулы лиганда (12-бромододеканола).

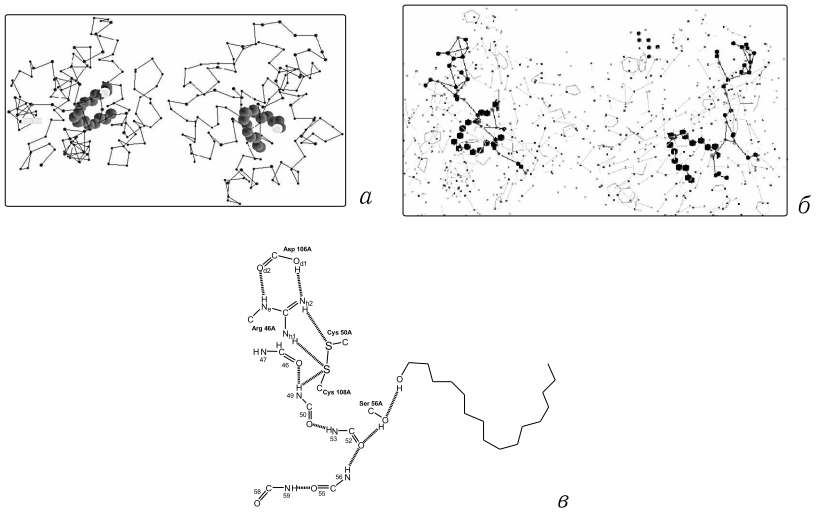


Рис. 12.6. Молекула феромона бамбикола в структуре феромон-связывающего белка (по данным работы [23]): *а* — альфа углеродный скелет; *б* — ССИВС; *в* — схема ССИВС в А субъединице

Вкусовые рецепторы. Наиболее активно изучаются рецепторы вкуса у млекопитающих и насекомых [19]. Во вкусовых луковицах языка находятся вкусовые клетки, содержащие связанные с G-белками рецепторы и канальцы, которые ответственны за обнаружение различных качеств вкуса, а именно: горького, сладкого, бульонного (вкус глютаминовой кислоты), кислого и соленого. У млекопитающих сладкий и бульонный вкус являются сигналами пищи, в то время как горький вызывает отпугивающее поведение, так как обычно является признаком ядовитого вещества. Анализ многочисленных обзоров, посвященных вкусовым рецепторам [34–38], показывает, однако, что наибольшие успехи достигнуты в изучении физиологии рецепторных

клеток и генетики рецепторных белков. В то же время, данных о третичной структуре белков, распознающих различные качества вкуса, нами в литературе пока не найдено. Надо полагать, что они появятся в ближайшие годы.

12.3. Внутрисистемные рецепторы

Хотя вещества, осуществляющие внутрисистемный химический перенос информации встречаются во всех группах организмов, в том числе и в растениях (можно вспомнить гормоны растений — ауксины), мы сосредоточим основное внимание на позвоночных животных и в первую очередь на млекопитающих, имеющих сходные с человеком принципы внутрисистемной химической регуляции. Общие представления о существующих гормонах и медиаторах животных и человека хорошо изложены в работе [3]. Здесь мы лишь кратко напомним основные типы гормоны и медиаторов, а также места их продуцирования в животных организмах.

Можно выделить несколько областей организма, где продуцируются медиаторы и гормоны. Нейромедиаторы, информационные химические сигналы синаптических окончаний нервных клеток мозга, в основном относятся к классу аминосодержащих низкомолекулярных соединений. Помимо медиаторов в мозгу вырабатывается большое разнообразие нейропептидов, состоящих из нескольких аминокислот. Что касается гормонов, как пептидной природы, так и небелковой, то имеется несколько областей животных организмов (в основном, желез), где происходит их синтез. Во первых, это гипоталамус и гипофиз, расположенные в мозгу, где выделяется множество разнообразных гормонов пептидного характера (в частности, кортикотропин, соматотропин, окситоцин и другие). Во вторых, это щитовидная железа, в которой синтезируется группа иодсодержащих гормонов (тироксин и др.). В третьих, это надпочечники, в которых осуществляется синтез адреналина и других гормонов (минералокортикоидов и глюкокортикоидов). Наконец, в четвертых, это половые железы, в которых вырабатываются мужские и женские половые гормоны (тестотстерон, эгостерон и др.), являющиеся важными регуляторами метаболизма. Последние две группы объединяются на основе стероидной природы этих гормонов. Перечисленные соединения имеют соответствующие клетки-мишени, а в них — рецепторы (чаще всего белковой природы). В этом разделе будет кратко изложено состояние структурных исследований внутрисистемных рецепторов этих веществ.

12.3.1.1. ***Нейромедиаторы.*** К числу наиболее известных нейромедиаторов относятся амины — ацетилхолин (АХ), гамма-аминомасляная кислота (ГАМК), гистамин, серотонин (5-окситриптамин), катехоламины — адреналин, норадреналин и дофамин, а также аминокислоты — глицин, глютаминовая кислота. Структура аминов и катехоламинов приведена на рис. 12.7, структура аминокислот — в разделе 2.3.4. Как видно из рис. 12.7, все аминосодержащие медиаторы имеют общий принцип построения: аминовый «хвостик» и различные по структуре функциональные «головки». Возможное назначение этих элементов в составе ССИВС уже обсуждалось в разделе 12.1.1. (см. рис. 12.1). К настоящему времени в кристаллическом виде выделены и изучены структуры рецепторов ацетилхолина, глютаминовой кислоты и глицина.

Ацетилхолин. Как известно, АХ вырабатывается в пресинаптической области нервных окончаний и заключен в синаптические пузырьки. Под влиянием нервного

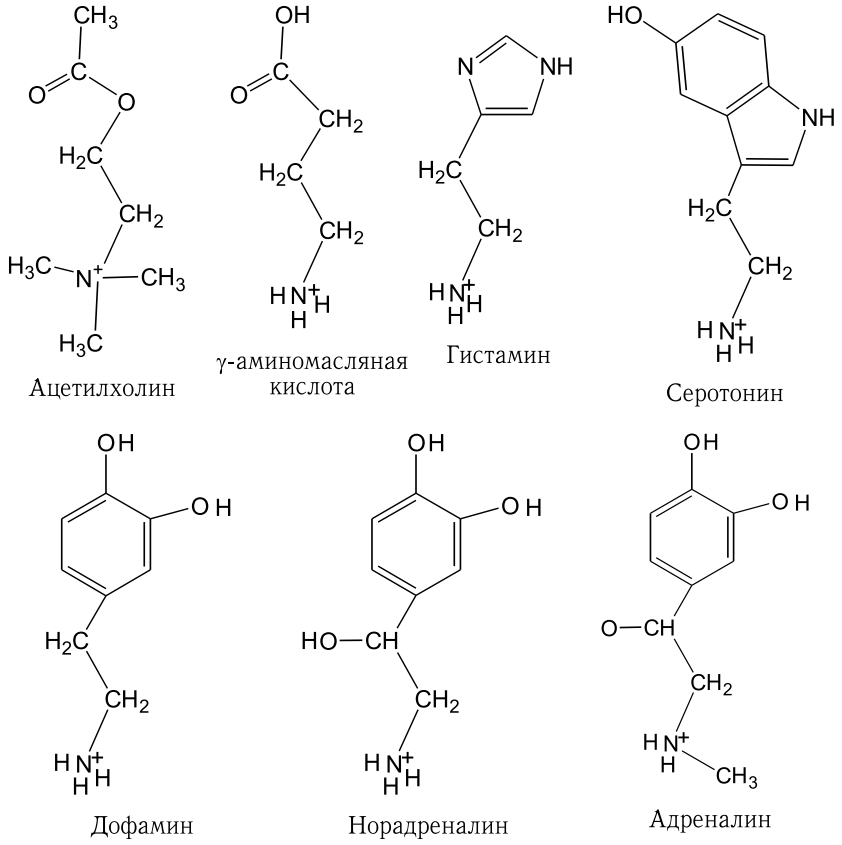


Рис. 12.7. Структура нейромедиаторов

импульса АХ высвобождается в межсинаптическую щель. Там он попадает на рецептор АХ, расположенный в постинаптической мембране, в результате чего происходит деполяризация постинаптической мембраны следующей нервной клетки и нервный импульс передается дальше. Избыток АХ разрушается ферментом АХ-эстеразой. По существу, эти рецепторы являются примером открываемых с помощью лигандов ионных каналов. Различают два типа рецепторов АХ — мускаринового и никотинового типа, чувствительные, соответственно, к мускарину и никотину.

В современной литературе оба типа рецепторов привлекают пристальное внимание. Так, рецепторы АХ мускаринового типа относятся к классу сопряженных с G-белками и проявляют способность к множественному аллостерическому связыванию разнообразных лигандов [39–41]. Однако, молекулярная структура рецепторов АХ мускаринового типа, из-за проблем с получением в кристаллическом виде, до настоящего времени остается практически не изученной. Известны лишь структуры, исследованные методом ЯМР (2csa), но они не пригодны для анализа структуры ССИВС. По этой причине имеются трудности и в интерпретации получаемых эффектов.

Значительно больший успех достигнут в изучении рецепторов АХ никотинового типа. Вместо трудно выделяемых рецепторов позвоночных животных в качестве

модели были использованы растворимые в воде рецепторы моллюсков — прудовика Lymnaea stagnalis (файлы 1uv6, 1uw6, 1ux2 [42, 43]) и морского зайца Aplysia californica (файлы 2br8, 2byn, и др. [44, 45]). Принципиально обе структуры устроены одинаково. Это циклические пентамеры (группа симметрии C_5), кристаллизующиеся в виде димеров, в центре которых расположен ионный канал. Хотя структур получено довольно много, наиболее адекватны биологическому состоянию структуры рецептора в комплексе с карбамилхолином, у которого вместо метильной группы — аминогруппа (файл 1uv6) и с никотином — ингибитором этого рецептора (файл 1uw6).

Как видно на рис. 12.8, *а*, *б*, комплекс рецептора с карбамилхолином кристаллизуется в виде двух пентациклов, связанных по принципу «голова к голове». При этом молекулы карбамилхолина (в прямоугольниках) занимают в одном из пентациклов лишь два места связывания ацетилхолина из пяти возможных (рис. 12.8, *в*). На рис. 12.8, *г* видно, холиновая группировка изолирована от белка и находится в гидрофобной полости, образованной двумя остатками триптофанов (справа) и тремя остатками тирозинов (два слева и один внизу). В то же время, карбамильная часть, как видно на рис. 12.8, *д*, связывается с ССИВС рецептора. При этом можно отметить, что один фрагмент ССИВС, расположенный справа, принадлежит одной субъединице, а другой фрагмент, над молекулой карбамилхолина, принадлежит другой субъединице (в прямоугольниках). Этот факт — пример реализации принципа непрерывности ССИВС, переходящих из одной субъединицы в другую (см. раздел 11.3.2.1).

На рис. 12.9, *а* показана общая структура комплекса ацетилхолинового рецептора с никотином, который кристаллизуется «бок о бок». Этот вариант кристаллизации пентамера, как нам кажется, более соответствует его положению в мембране. Никотин связывается со всеми 10 субъединицами, что хорошо видно на рис. 12.9, *б*, (в прямоугольниках). На рис. 12.9, в показаны ССИВС между никотином и рецептором в одном из мест связывания.

Из сравнения рис. 12.8, *е* и 12.9, *в* можно заключить, что структура ССИВС в комплексах рецептора с карбамилхолином и никотином близка между собой. Более детально мы представили их в виде схем. Как видно на рис. 12.10, *а*, HN–C=O-группа карбамилхолина образует водородную связь с O=C–NH группой 143,144, к которой присоединена ССИВС, содержащая на конце Tyr 89C. С другой стороны от O=C–NH группы находится Thr 144C, к которому присоединен Ser 75D, и далее через Arg 104D эта ССИВС продолжается в D-субъединице в виде β-структуры. Аналогичную структуру ССИВС имеет молекула карбамилхолин, расположенная во втором пентамере. Структура ССИВС связанная со второй молекулой карбамилхолина, находящейся в первом пентамере, близка к двум предыдущим (в ней отсутствует ветвь с Cys 188 и Tyr 182). В субъединицах, в которых нет карбамилхолина, данная ССИВС также аналогична, за исключением связи с Tyr 89C, которая отсутствует.

В случае никотина O=C–NH группа 143, 144 находится на расстоянии водородной связи от атомов азота никотина. При этом происходит некоторое, на наш взгляд, не очень значительное изменение структуры ССИВС. Со стороны Tyr 89C присоединяется Tyr 185C и Lys 139C, а в D-субъединице на конце присоединяется Asp 153D и меняется расположение водородных связей у Lys 180D. Анализ остальных субъединиц комплекса с никотином показывает, что для в них также наблюдаются вариации связей на конце β-структуры.

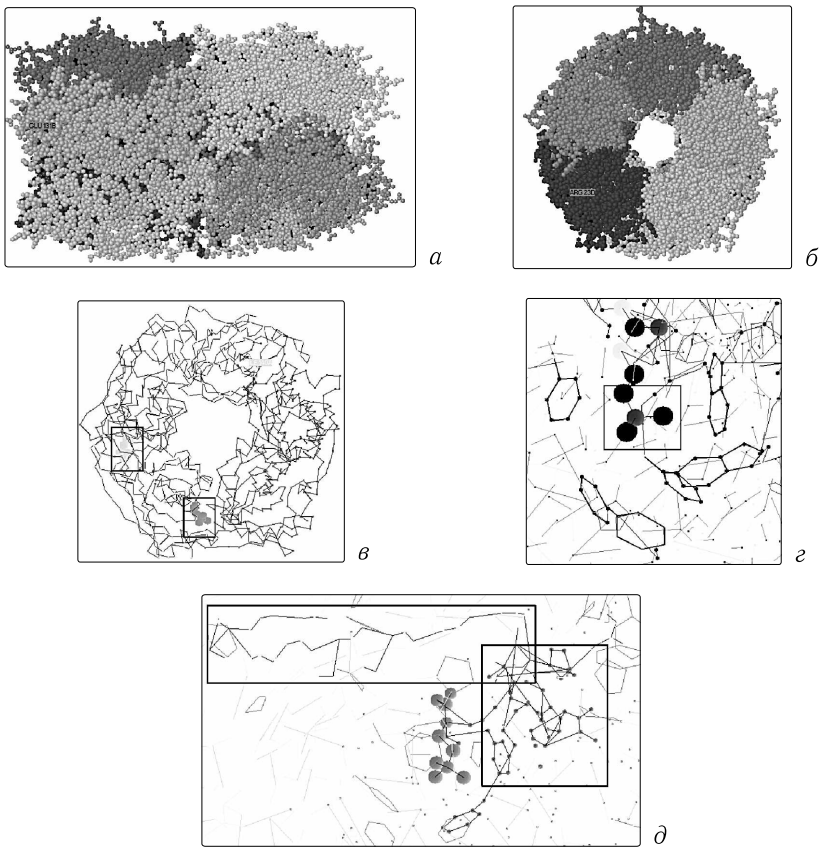


Рис. 12.8. Структура комплекса рецептора ацетилхолина прудовика с карбамилхолином (по данным [43]): *а*, *б* — общий вид сбоку и сверху; *в* — расположение карбамилхолина в двух субъединицах; *г* — окружение холиновой группировки; *е* — ССИВС, связанные с карбаминовой частью карбамилхолина

В целом проведенный анализ позволяет предполагать, что именно эта ССИВС находится в контакте в ацетилхолином и изменения в ней, вероятно, инициируют ряд последующих конформационных изменений. Отметим, что в присутствии других соединений (файл 1ux2) структура данной ССИВС существенно не изменяется.

Глютаминовая кислота. Глютаминовая кислота (глютамат) выполняет функцию одного из нейромедиаторов и поэтому в головном мозгу животных встречается в большом количестве. Как и рецетпоры ацетилхолина, рецепторы глютамата относят к типу ионотропных, поскольку они представляют собой каналообразующие белки, регулирующие поступление ионов через мембрану [46]. Выделяют три подгруппы этих рецепторов (iGluR): связывающие α-амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионовую кислоту (АМПК-рецепторы), каинат-связывающие рецепторы и *N*-метил-D-аспартат связывающие (N-МДА-рецепторы). Каждая из групп обладает как общими с другими группами чертами, таких как зависимость от G-белков, так и рядом особенностей [46, 47]. Считают, что iGlu-рецепторы проявляют стехиометрию «димера димеров» (тетрамеров). При этом N-МДА рецепторы состоят

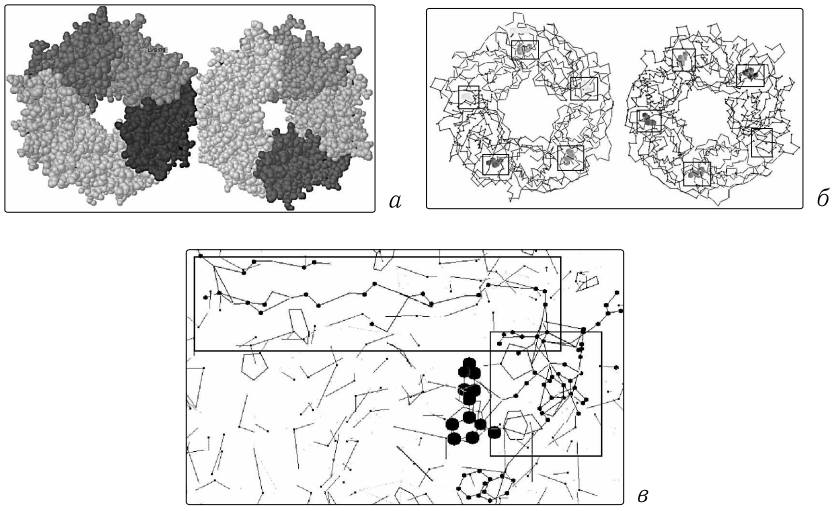


Рис. 12.9. Структура рецептора ацетилхолина прудовика в комплексе с никотином (по данным [43]): *а* — общий вид сбоку; *б* — расположение молекул никотина в субъединицах; *в* — ССИВС, связанные с молекулой никотина

из двух NR1 и NR2 субъединиц (файл 2a5t), в то время как АМПК (файлы 1ftj, 1s5o) и каинат-связывающие (1s7y, 1txf, 1tt1) рецепторы могут существовать как в гомомерной, так и гетеромерной конфигурации.

В нашей книге мы остановимся на варианте N-МДА рецепторов, гетеродимерая структура которых недавно расшифрована [48]. Функция этого рецептора (файл 2a5t) характеризуется медленным открыванием канала и деактивацией, в результате чего вход ионов инициирует каскад сигналов, связанных с высшими функциями мозга, такими как память и обучение. В составе гетеродимера, одна субъединица связывает глицин (NR1), а вторая — глутамат (NR2A). На рис. 12.11, *а* показана общая структура гетеродимера. Видно, что в левой субъединице находится глицин (молекула небольшого размера в прямоугольнике), а в правой — глютаминовая кислота. При выделении ССИВС с учетом координат молекул воды глицин и глютамат оказываются встроенными в единую систему (рис. 12.11, *б*), размер которой, за счет включения воды, охватывает всю структуру гетеродимера. В то же время, без учета воды (рис. 12.11, *в*) ССИВС окружают как молекулу глицина, так и глютаминовой кислоты (выделены в прямоугольниках), но, как видно на рисунке, они не связаны между собой. Более детально структуры ССИВС, окружающих молекулы лигандов, представлены в виде схем на рис. 12.12, *а*, *б*.

Схемы построены таким образом, чтобы положение амино- и карбоксильного остатков у α-углеродного атома обеих аминокислот (показаны и обозначены в прямоугольниках) занимали одинаковое положение. Сравнение этих схем, показывает, что в общих чертах положение аминокислот в субъединицах совпадает. Так, карбоксильный остаток в обоих случаях входит в состав ССИВС, связанных с аргинином и фрагментом α-спирали (слева внизу), а аминогруппа — через ряд аминокислот включается в ССИВС, связанные с другим α-спиральным фрагментом (справа вверху). Карбоксильная группа боковой цепи глютамата (рис. 12.12, *б*), также входит в ССИВС, которая с одной стороны заканчивается Arg 176B и Glu 120B,

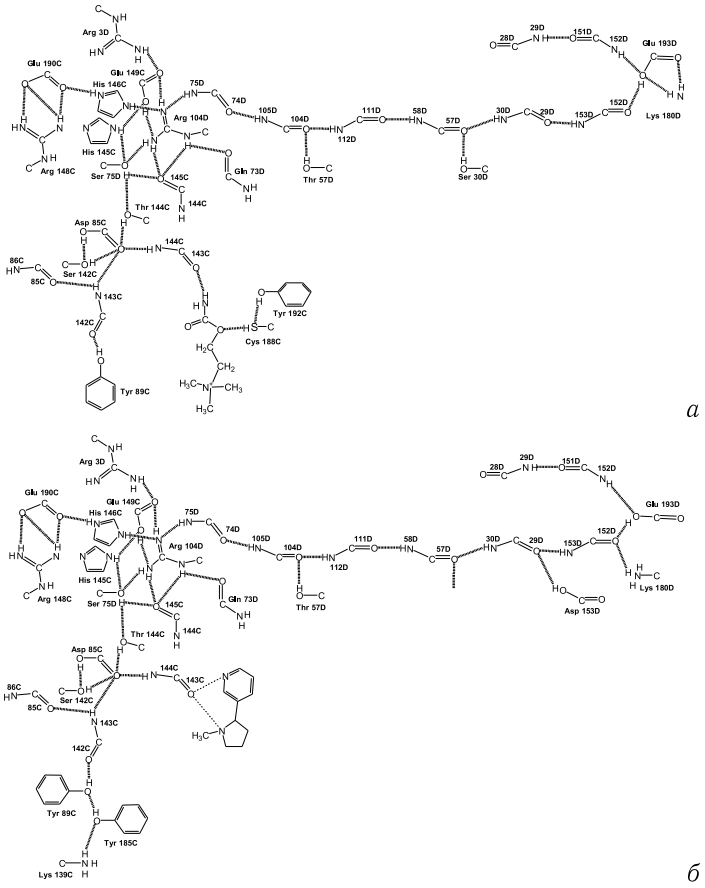


Рис. 12.10. Схема ССИВС, связанных с карбамилхолином (*а*) и никотином (*б*)

а с другой стороны — через Thr 174, фрагментом β-структуры (справа в центре). Анализ ССИВС с учетом координат воды позволил установить, что переход систем из одной субединицы в другую осуществляется через молекулы воды. Один из таких переходов связывает His 272A и HN–C=O-группу (241, 240) субъединицы B (показаны стрелками). Детальный анализ ССИВС не входит в нашу задачу. Отметим, однако, что включение функциональных групп обеих аминокислот в состав ССИВС вполне соответствует требованиям нашей модели сенсора (схема 12.1).

Структура гистамин-связывающего белка. Гистамин представляет для нас особый интерес, так как включение этой молекулы в состав ССИВС были предсказаны до того, как была выяснена структура его рецепторов [2, 5]. В настоящее время, однако, изучен не гистаминовый рецептор из мембран, а гистамин-связывающий белок из слюны клеща (файл 1qft, рис. 12.13.), который способен конкурировать с рецептором гистамина в крови млекопитающих и вызывать антикоагулирующий эффект [49]. Тем не менее, особенности этой структуры, как модели гистаминового рецептора, представляют интерес. Как видно на рис. 12.13, *а*, этот белок является димером, который способен связывать две молекулы гистамина. На рис. 12.13, *б* показано, что имидазольный цикл одного из гистаминов «зажат» между двумя карбоксильными

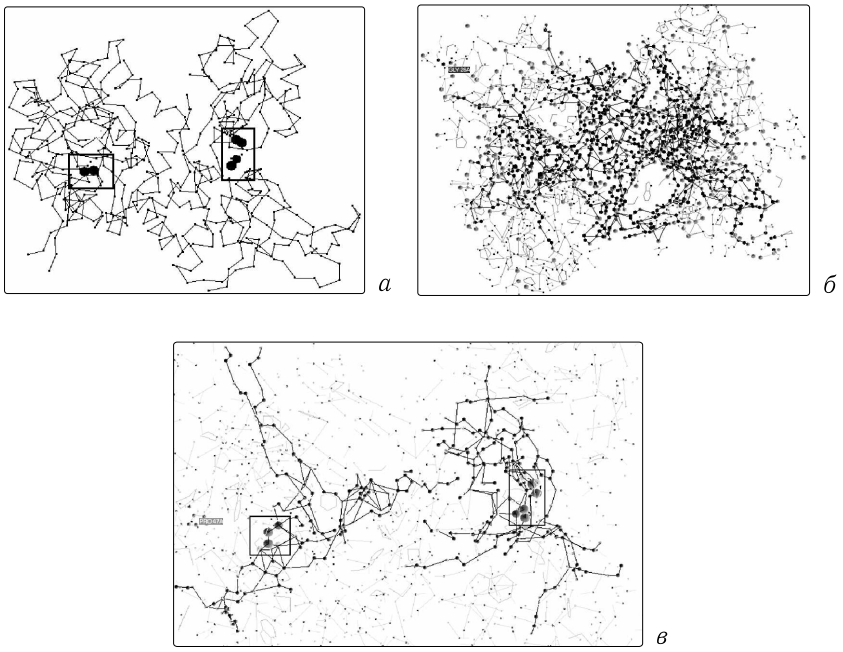


Рис. 12.11. Структура гетеродимера рецептора глютаминовой кислоты N-МДА типа (по данным [48]): *а* — общий вид гетеродимера; *б* — структура ССИВС с учетом координат молекул воды; *в* — структура ССИВС без учета молекул воды

группами. Аминогруппа не связана с имидазольным циклом и включена в состав другой ССИВС. Другая молекула гистамина (рис. 12.13, *в*), наоборот, связана со структурой белка так, что имидазольное кольцо и аминогруппа входят в единую ССИВС. Это видно даже без применения схемы.

Следует отметить, что данная структура анализировалась нами без использования координат молекул воды. Когда же эти координаты были учтены, то оказалось, что обе молекулы гистамина входят в состав содержащих воду ССИВС, которые охватывают практически всю молекулу белка (рис. 12.13, *г*). Сравнение с рис. 12.1 показывает, что идея включения молекул гистамина в состав ССИВС рецептора оказалась правильной.

12.3.1.2. ***Нейропептиды.*** В отличие от медиаторов, нейропептиды относятся к числу более долгоживущих соединений головного мозга. К ним обычно относят энкефалины и эндорфины, отличие между которыми состоит в длине пептидной цепи.

Энкефалины — это короткие пентапетпиды, пространственная структура которых напоминает структуру морфина — основного компонента опиума. Из них наиболее известны и имеют практическое применение метионин-энкефалин Tyr-Gly-Gly-Phe-**Met** и лейцин-энкефалин Tyr-Gly-Gly-Phe-**Leu,** впервые описанные в работе [50]. Эндорфины — это пептиды с большей длиной цепи (от 16 до 31 аминокислот), также частично имеющие сходство с опиатами. Обнаружено, что последовательности энкефалинов входят в состав цепи энодрфинов (например, β-эндорфина). Это «гормоны удовольствия». Являются главным звеном противоболевой системы организма и регулируют эмоции.

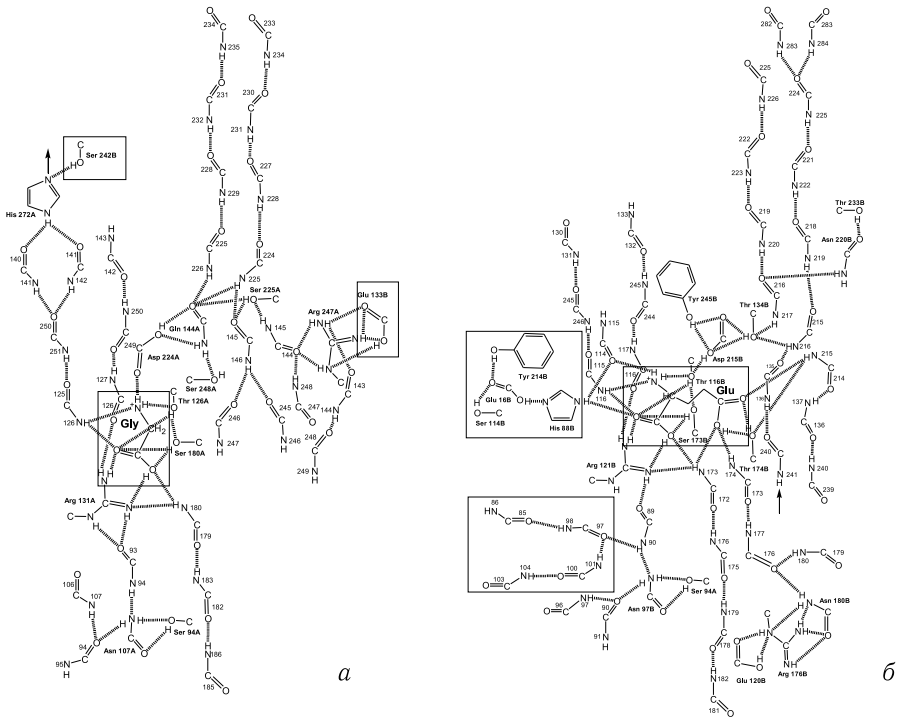


Рис. 12.12. Сопоставление ССИВС, включающих молекулу глицина (*а*) и глютамата (*б*) в структуре гетеродимера рецептора глютаминовой кислоты N-МДА типа (по данным [48])

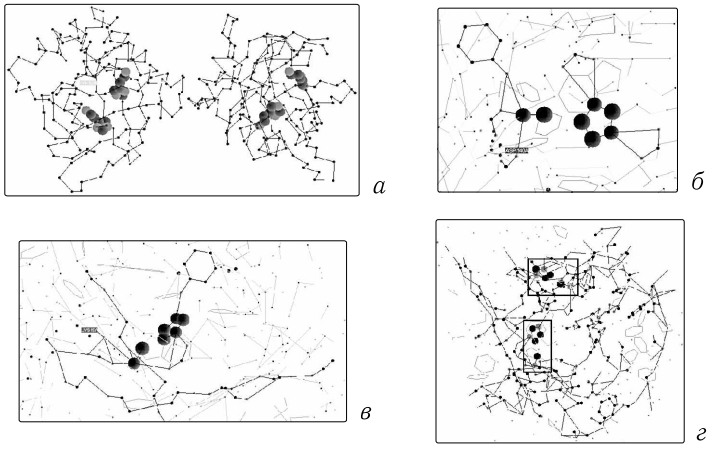


Рис. 12.13. Структура гистамин-связывающего белка из слюны клеща (по [46]): *а* — общий вид димера; *б*, *в* — молекулы гимстамина в составе ССИВС; *г* — структура ССИВС с учетом координат молекул воды

Исследованию рецепторов энкефалинов и эндорфинов, называемых также рецепторами опиатов, посвящено большое число работ [51]. Выделяют три группы опиоидных рецепторов — мю (μ), дельта (δ) и каппа (κ), каждая из которых охарак-

теризована по своим свойствам, молекулярной массе, количеству субъединиц в олигомере. Обычно это димеры, причем они могут состоять как из субъединиц одного типа (гомодимеры), так разных типов (гетеродимеры). По своим функциональным свойствам они принадлежат к семейству сопряженных с G-белками рецепторов (G protein-coupled receptors).

Сопоставим структуру морфина и лейцин-энкефалина, (рис. 12.14, *а*, *б*). Мы представили последний в форме цикла с водородной связью между $NH(i)\ldots O{=}C(i-4)$. Легко видеть, что имеется большое структурное сходство между левым фрагментом морфина (а) и остатком Tyr 1 в лейцин-энкефалине.

Можно предположить, что именно за счет этого фрагмента морфин может встраиваться в структуру рецептора энкефалина. Левый атом кислорода морфина будет конкурировать с Tyr 1 энкефалина за включение в ССИВС, а метилированная аминогруппа морфина будет разрывать ССИВС, образованную концевой аминогруппой энкефалина. Правый атом кислорода морфина также может конкурировать за включение в ССИВС, возможно образуемую С-концевым карбоксилом энкефалина. Пока молекулярная структура опиоидных рецепторов не установлена и будет интересно узнать, насколько совпадут данные предположения с экспериментом.

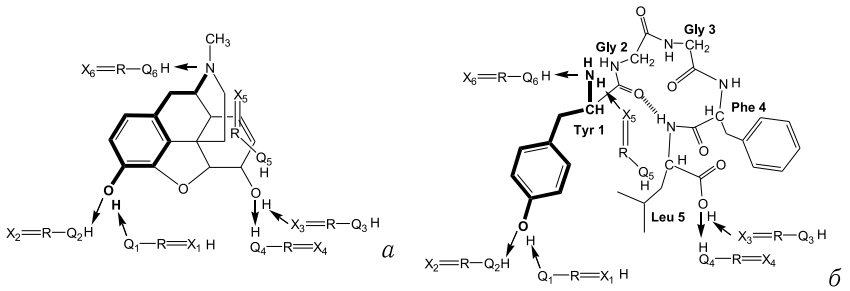


Рис. 12.14. Структуры морфина (*а*) и лейцин-энкефалина (*б*) в составе ССИВС

12.3.1.3. ***Гормоны гипоталамуса и гипофиза.*** Гипоталамус — один из нижних отделов головного мозга, и гипофиз — небольшая шаровидная железа, расположенная поблизости, образуют единую гипоталамо-гипофизарную систему, связанную с продукцией разнообразных пептидных гормонов. В частности, в гипоталамусе синтезируются рилизинг-факторы — гормоны, способствующие высвобождению других гормонов. При этом они чаще всего вызывают освобождение гормонов, синтезируемых в передней доле гипофиза. Перечислим эти факторы: кортикотропин-рилизинг-гормон, способствует синтезу β-эндорфина, адренокортикотропного, липотропного и меланоцитстимулирующего гормонов; соматотропин-рилизинг-гормон, вызывает синтез соматотропного гормона и пролактина; тиреотропин-рилизинг-фактор, стимулирует синтез тиреотропного гормона; гонадотропин-рилизинг-гормон, способствует синтезу гонадотропных гормонов - лютеинизирующего и фолликулостимулирующего (ФСГ). Очевидно, что все они должны иметь соответствующие рецепторы.

Гипофиз подразделяют на три доли: переднюю, среднюю и заднюю. Гормоны передней доли, вырабатываемые под действием рилизинг-факторов, были перечислены выше. В средней доле гипофиза из полипептидной цепи протогормона проопиомеланокортина синтезируются β-эндорфин, α-меланоцитстимулирующий гормон, кортикотропин, а также β- и γ-липотропный гормоны. К числу гормонов задней

доли гипофиза относятся окситоцин и вазопрессин, небольшие гормоны пептидной природы.

Из всех перечисленных гормонов в настоящее время наиболее изучена структура комплексов гормон-рецептор для соматотропного гормона (гормона роста) и фолликулостимулирующего гормона (ФСГ). Поскольку эти гормоны — такие же белки, как и их рецепторы, то в этом разделе мы фактически сталкиваемся с процессом белок-белкового узнавания.

Структура комплекса гормон роста–рецептор. Гормон роста (соматотропин), связанный с рецептором, расположенным в клеточных мембранах, необходим для регуляции нормального роста и развития человека. Его активность проявляется одновременно с действием половых гормонов и гормонов щитовидной железы. К настоящему времени гомон роста исследован как индивидуально (файл 1hgu), так и в комплексах с внеклеточным доменом его рецептора в соотношениях 1:1 (файлы 1a22, 1hwh (мутантный гормон)) и 2:1 (файлы 1hwg, 3hrr). Наиболее адекватным физиологическому состоянию является, очевидно, комплекс 2:1, который считается активированным комплексом, структура которого исследована с разрешением 2,8 Å (3hrr) и 2,5 Å (1hwg) [52–54]. Общий вид этого комплекса показан на рис. 12.15 *а*.

На рисунке видно, что гормон в этом комплексе зажат между двумя субъединицами рецептора и в этом смысле структура внешне похожа на структуру комплексов антигенов с иммуноглобулинами. Структура гормона содержит 4 α-спиральных фрагмента, примерно параллельных друг другу, а рецептор состоит из двух β-структурных участков, в промежутке между которыми и располагается гормон. Комплекс 1hwg, изученный к настоящему с времени наибольшим разрешением был использован нами, с учетом координат молекул воды, для анализа ССИВС (рис. 12.15, *б*). На этом рисунке видно, что в центре (в прямоугольнике) располагаются зоны ССИВС α-спиральных фрагментов гормона роста, к которым по бокам присоединены зоны b- и c-субъединиц рецептора (соответственно, слева и справа). Таким образом, если учитывать воду в составе ССИВС, встраивание гормона между субъединицами рецептора приводит к объединению трех подсистем ССИВС.

Ввиду того, что анализ этих ССИВС представляет определенный интерес, мы приводим его полностью на рисунках 12.16. (область контакта гормона с b-субъединицей) и 12.17.(контакт с c-субъединицей). На рис. 12.16 видно, что основную роль в связывании гормона принимает его α-спиральный фрагмент, начинающийся сверху HN–C=O-группой (157, 156) и заканчивающийся HN–C=O -группой (184, 183). В состав ССИВС, образованной на основе этого фрагмента, входят Asp 163A, Ser 55A и Trp 86A, расположенные справа от фрагмента вверху, и Ser 184A, находящийся слева внизу. В центре к этому фрагменту присоединен The 176A, с которым связана Asp 171A. Именно через эти две аминокислоты гормона с левой стороны осуществляется связь с b-субъединицей рецептора. Боковые цепи этой субъединицы Trp 104B, Arg 43B, Asp 164B и Glu 44B (заключены в прямоугольники) участвуют в формировании единой ССИВС. Справа с участием The 176A и Asp 171A развивается фрагмент ССИВС принадлежащих боковым цепям аминокислот как гормона (с буквой A), так и рецептора (с буквой B): Glu 174A, Asn 218B, His 18A, Arg 217B. Через молекулу воды 163 к этой системе присоединяются Arg 178A и дисульфидная группа Cys 189A-Cys 182A. Боковая цепь Asn 218B соединена с другим α-спиральным фрагментом, состоящим из двух ССИВС, к которым внизу

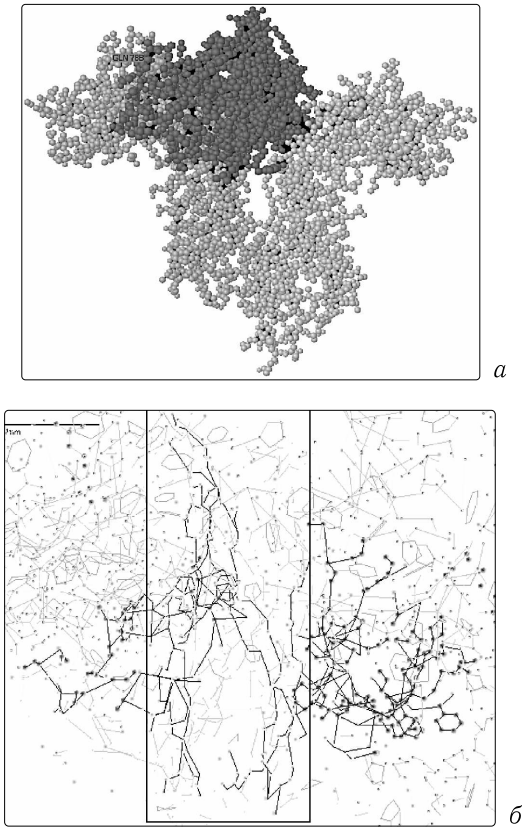


Рис. 12.15. Структура комплекса гормона роста (мутантной формы) с двумя субъединицами рецептора (файл 1hwg), по данным [54]): *а* — общий вид комплекса; *б* — ССИВС между гормоном, и b и с субъединицами кофактора

присоединены две молекулы воды (56 и 53). С правой стороны к этому фрагменту присоединена боковая цепь Asn 12A, HN–C=O-группа которого является связующим звеном с ССИВС с-субъединицы (рис. 12.17.).

На рис. 12.17 преобладают боковые цепи с-субъединицы, поэтому для наглядности в прямоугольники заключены боковые цепи и некоторые HN–C=O-группы гормона. Asn 12A своей HN–C=O-группой встраивается в состав ССИВС с-субъединицы. Со стороны NH боковые цепи Arg 8C и Asp 126C формируют одну ветвь, заканчивающаяся двумя тирозинами (Tyr 107C, Tyr 68C). Со стороны C=O ССИВС продолжается через Arg 43C, с которым связан Trp 169C, а далее, через боковые цепи гормона Arg 16A, Asp 116A, заканчивается Trp 104C. Последний образует водородную связь с третьим α-спиральным фрагментом, который вверху связан с Arg 134A. Хотя структурные данные со временем будут уточнены, в целом можно сказать, при образовании комплекса гормон–рецептор (1 : 2) в нем образуется непрерывная ССИВС. В ее формировании участвуют как боковые цепи аминокислот гормона, так и обеих субъединиц рецептора, причем ССИВС гормона обеспечивает взаимосвязь ССИВС b и с субъединиц. В этом, а не в изменении конформации или

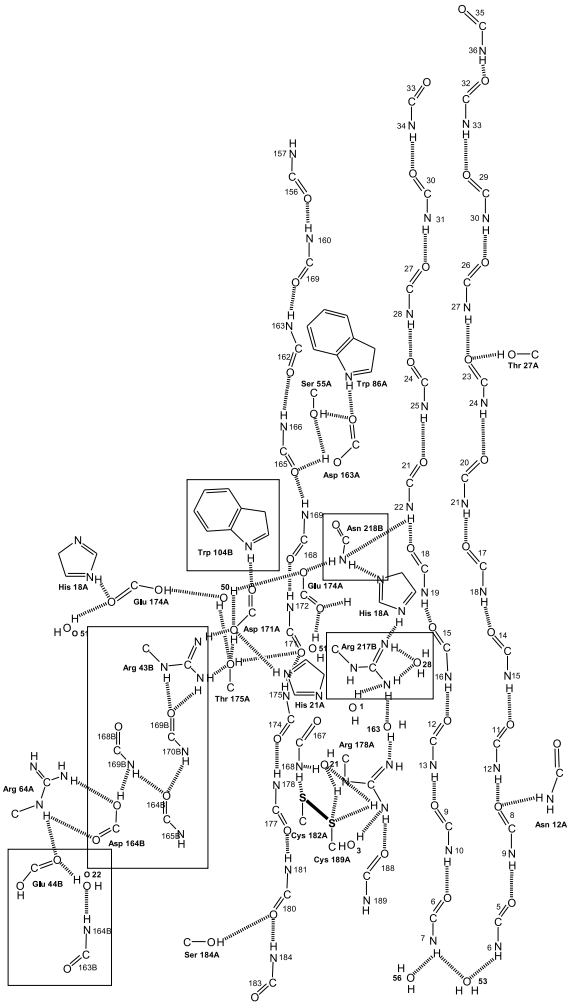


Рис. 12.16. Структура ССИВС комплекса гормона роста–рецептор в области контакта гормона с b-субъединицей (по [54])

вращении [55], на наш взгляд, и состоит активирующая роль гормона, приводящая к формированию комплекса 1 : 2.

Отметим, что авторами работ [53, 54], разумеется, не остались не замеченными «детерминантные» аминокислоты Arg 43, Trp 104 и Trp 169, участвующие в образовании комплекса. Однако настоящее значение этих и других аминокислот выявлено лишь в процессе их анализа в составе ССИВС.

Нетрудно убедиться, что данный механизм соответствует нашей модели сенсора (раздел 12.1.1.), рассматривающей лиганд (в данном случае белковый гормон) в качестве замыкателя ССИВС. Данный комплекс является также хорошим примером дополнительности групп, входящих в ССИВС, принадлежащих разным белкам (см. раздел 7.2.2.4).

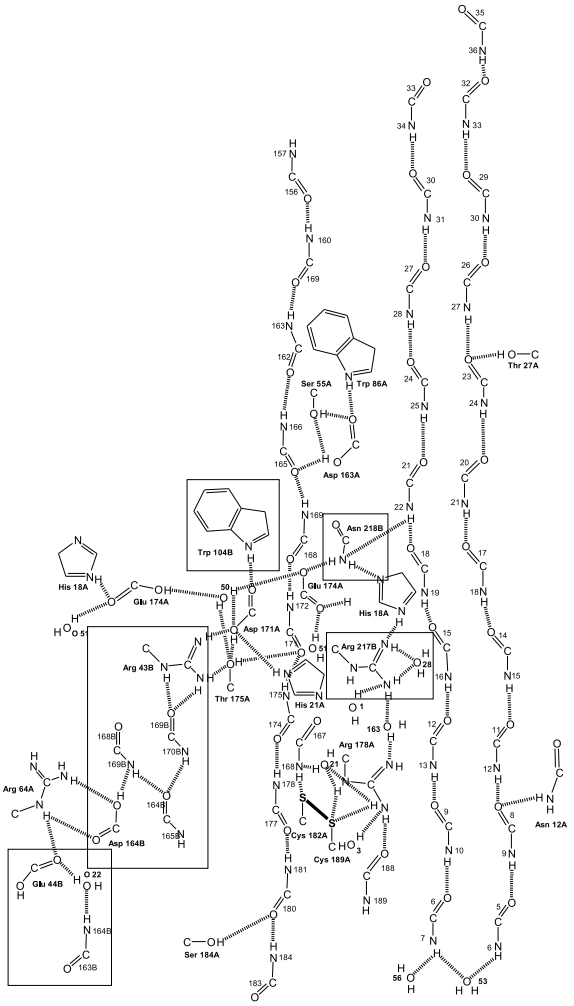


Рис. 12.17. Структура ССИВС комплекса гормона роста–рецептор в области контакта гормона с с-субъединицей (по [54])

Комплекс фолликулостимулирующего гормона со своим рецептором. ФСГ принадлежит к группе гонадотропных гормонов. Он оказывает стимулирующее воздействие на образование фолликулов в яичниках, а также повышает секрецию женских половых гормонов (эстрогенов) яичниками.

Изучена молекулярная структура как самого гормона, представляющего собой гетеродимер (состоит из α- и β-субъединиц) [56], так и комплекса с внеклеточным доменом его рецептора, локализованного мембранах клеток яичников [57]. Разрешение обеих структур не очень высокое (2,9А) и можно ожидать новых работ. Вид комплекса ФСГ-рецептор, ленточные структуры гормона и рецептора и а также ССИВС комплекса приведены на рис. 12.18, *а–г*.

На рис. 12.18, *а* видно, что гетеродимер гормона как бы «сидит верхом» на субъединице рецептора. При этом как гормон, так и рецептор содержат протяженные

β-структуры (Рис. 12.18 *б, в*), причем направление ССИВС HN–C=O-групп в комплексе у них взаимно перпендикулярное. По данным работы [57] комплекс является димером, в котором контакт происходит за счет субъединиц рецептора. Однако взаимосвязь между субъединицами слабая и практически не найдено сколько-нибудь протяженных ССИВС, переходящих из одной субъединицы в другую. Как видно на рис. 12.18, *г*, в обеих субъединицах рецептора обнаруживаются симметричные протяженные ССИВС, однако с гормоном они контактирует только по одной группе (с C–N-группой Lys 91 A-субъединицы гормона и HN-C=O-группой (47, 46) D-субъединицы), помещенной в прямоугольник, причем учет молекул воды практически не

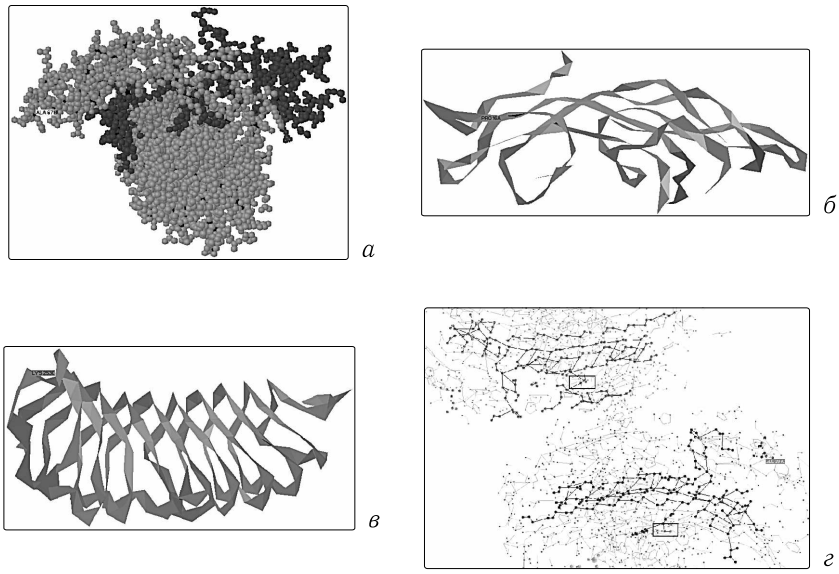


Рис. 12.18. Структура комплекса фолликулостимулирующий гормон–рецептор (по данным рапботы [57]: *а* — общий вид комплекса ФСГ-рецептор; *б*, *в* — ленточные структуры гормона и рецептора (видна β-структура); *г* — ССИВС димерного комплекса

изменяет картину. Контакты гормона с рецептором имеют вид связи ССИВС гормона с одиночными группами аминокислот рецептора.

Таким образом, в случае комплекса ФСГ-рецептор протяженные ССИВС, переходящие из гормона в рецептор и наоборот, не наблюдаются. Для объяснения этого можно привести много причин, однако пока имеет смысл воздержаться от комментариев и дождаться структур с большим разрешением.

12.3.2. Гормоны щитовидной железы. К гормонам щитовидной железы относится две группа гормонов, относящихся к различным классам. Первая группа синтезируется на основе аминокислоты тирозина и содержащит в своей структуре различное количество атомов иода в качестве заместителей атомов водорода — 3,5-дийодтирозин, 3,5,3'-трийодтиронин (Т3), 3,5,3'5'-тетрайодтиронин (тироксин, Т4). Эти гормоны обладают широким спектром действия. Недостаток йода, необходимого для синтеза этих гомонов вызывает гипертрофию зобной железы (зоб). Вторая группа гормонов — это белковые гормоны, из которых наиболее важным является

тиреокальцитонин (или кальцитонин), принимающий участие в регуляции фосфорно-кальциевого обмена.

Рецепторы тироксина. Прежде чем перейти непосредственно к данным по структуре рецептора тироксина рассмотрим эту молекулу в составе ССИВС. Соединения близкой структуры были рассмотрены в разделе 6.2, однако учитывая частный характер, более логично это сделать в сейчас. Как показано на рис. 12.19, эта молекула, в принципе, имеет три функциональных группы, вокруг которых могут возникать ССИВС: область гидроксильной -группы (C=C–OH, система 1, 1 вход — 1 выход), область аминогруппы (C–NH_2, 2 входа –1 выход) и область карбок-

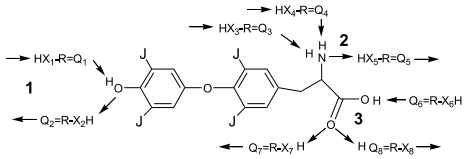


Рис. 12.19. Молекула тироксина в составе ССИВС

сильной группы (O=C–OH, 1 вход — 2 выхода). Как было рассмотрено в разделе 6.3.1, количество выходов (а возможно, и входов) может быть вырождено, поэтому в реальной структуре строение ССИВС может быть более простым. Это возможно также по причине того, что наличие в циклах Т3 и Т4 атомов йода, имеющего высокую электрооотрицательность, делает эту молекулу своеобразной «ловушкой» для электронов. Наличие C=C–OH-группы, входящей в шестичленный цикл и электроотрицательных заместителей в циклах должны придавать ему свойства, близкие к 2,4-динитрофенолу (ДНФ), разобщителю энергетического сопряжения [58].

В разделе 12.3.1.1 мы сталкивались с сочетанием C–NH_2- и O=C–OH-групп при рассмотрении рецепторов глицина и глютаминовой кислоты. В них это сочетание входит в состав ССИВС, состоящих из двух ветвей (рис. 12.12.). Аналогичную структуру можно ожидать и для рецептора тироксина.

В отличие от ранее рассмотренных мембранных рецепторов, рецепторы тироксина (β-типа), являются рецепторами клеточного ядра, регулирующими активность генов. Их структура, в комплексе с Т3 и Т4 гормонами недавно исследована с разрешением 2,5 (файл 1xzx) и 3,1 Å (файл 1yox), соответственно [59]. Структура связывающих их ССИВС, в принципе аналогична, хотя имеются и некоторые различия. Считается, что молекулы Т3 являются истинными гормонами, а Т4 — агонистами (конкурентами). По этой причине мы подробно рассмотрим структуру с гормоном Т3, изученную к тому же с лучшим разрешением, а вторую структуру будем использовать лишь при их сравнении.

Как показано на рис. 12.20, *а*, в структуре рецептора тироксина преобладают α-спирали, которые образуют полость, доступную для молекулы Т3 (в правой части рисунка). Прочность конструкции фиксируется благодаря наличию трех пар дисульфидных связей (видны в виде парных кружков). На рис. 12.20, *б* приведен общий вид молекулы Т3 в структуре ССИВС. На этом рисунке видно, что C=C–OH-группа связана с одной ССИВС через пятичленный цикл гистидина (в квадрате), а вокруг амино- и карбоксильного участка находится развитая ССИВС, образованная α-спиральными фрагментами рецкптора.

Более детально структура ССИВС, которая окружает молекулу Т3-гормона показана на рис. 12.20, *в*. Для сравнения с рис. 12.12 мы изобразили молекулу Т3 с таким же расположением амино- и карбоксильной групп (в прямоугольнике). Из сравнения обоих рисунков можно сделать вывод о принципиальном сходстве этой части молекул Т3 и глютамата. Слева в обоих соединениях с аминогруппой

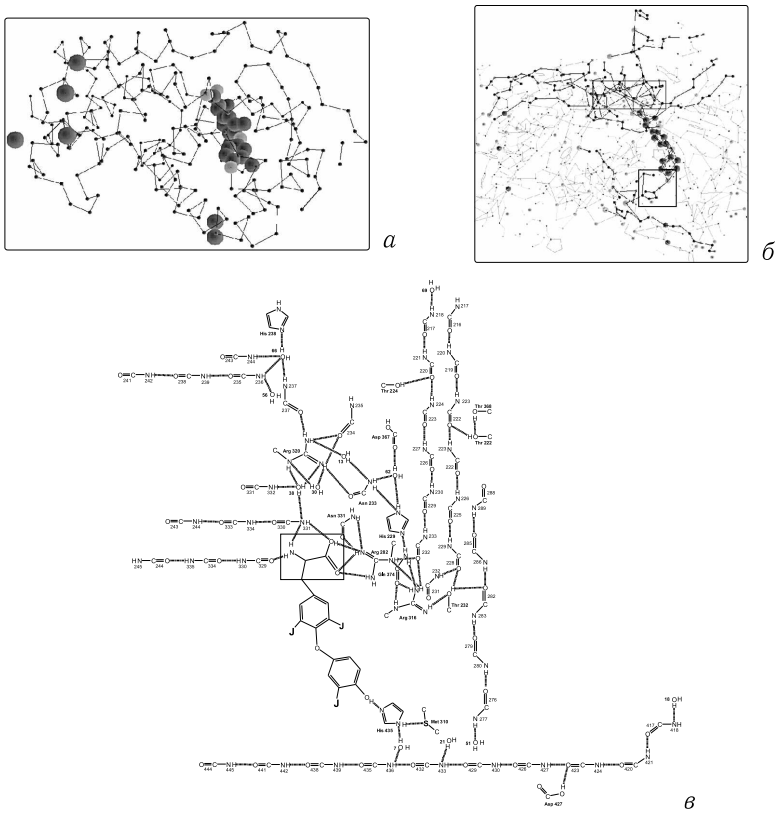


Рис. 12.20. Молекула гормона щитовидной железы (Т3) в структуре белкового рецептора (файл 1xzx, по данным работы [59]): *а* — общий вид комплекса (показан α-углеродный скелет белка); *б* — молекула тироксина в составе ССИВС; *в* — детальная структура ССИВС

связаны короткие α-спиральные фрагменты, а справа — более протяженный участок α-спирали с двумя параллельными ССИВС, состоящими из систем HN–C=O-групп. Интересно, что молекула His 435, имеющая один выход, соединяет C=C–OH-группу молекулы Т3 с α-спиральным фрагментом в нижней части структуры через молекулу воды (H_2O 7). Сравнение с комплексом тироксин (Т4) — рецептор (файл 1yox) показывает, что вся область амино- и карбоксильной групп сохраняет связи с ССИВС белка в неизменном виде, в то время как со стороны C=C–OH-группы цикл His 435 оказывался изолированным от спиральной части белка. Впрочем, ввиду низкого разрешения этот вопрос, вероятно, еще будет уточняться. В целом, однако, как и во многих других примерах, молекула гормона своими основными функциональными группами включилась в состав ССИВС рецептора.

12.3.3.1. ***Краткая характеристика стероидных гормонов.*** Стероидные гормоны — липофильные молекулы на основе холестерина и синтезируемые в коре надпочечников (глюкокортикоиды, минералокортикоиды, и надпочечные андрогены), семенниках (андрогены и эстрогены), яичниках и плаценте (эстрогены и прогестагены или прогестины) [60]. Все они синтезируются из холестерина путем последовательных превращений [3]. Основная их роль — регуляция обменных процессов. Так, глюкокортикоиды (основной гормон кортизол) регулируют глюконеогенез, образование гликогене и способствую расщеплению жиров и белков. Минералокортикоиды (основной гормон — альдостерон) увеличивают обратное всасывание ионов натрия, хлора и сульфатов в почках, тем самым повышают объем крови и кровяное давление. Половые гормоны, мужские — андрогены (основной гормон — тестостерон) и женские — эстрагены (эстрадиол), отвечают за появление вторичных половых признаков, соответственно, у самцов и самок. Структура перечисленных гормонов

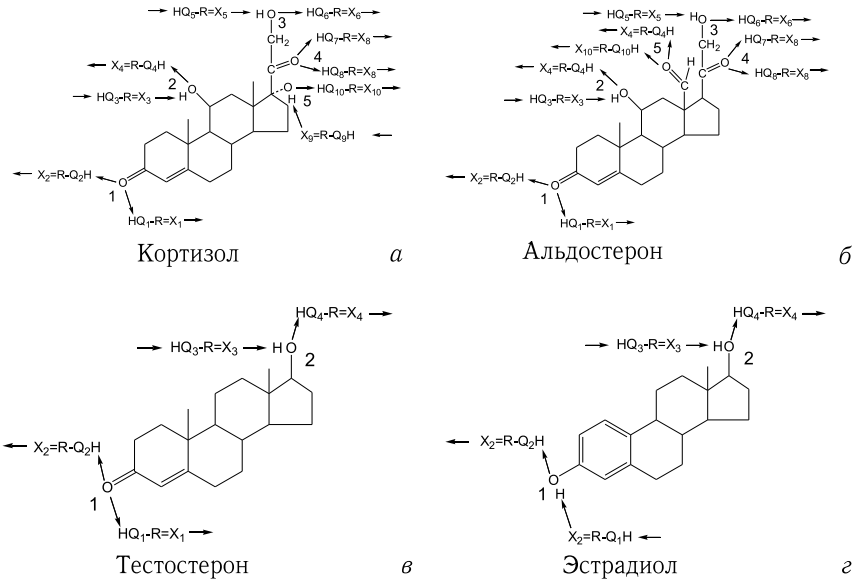


Рис. 12.21. Структура некоторых стероидных гормонов в составе ССИВС

в составе ССИВС показана на рис. 12.21, *а–г*. Как видно на этих рисунках, вокруг функциональных групп этих гормонов могут формироваться ССИВС двух типов: вокруг кето-групп — ССИВС, имеющие только входы (например, 1 и 4 вокруг кортизола, 1, 4 и 5 вокруг альдостерона и 1 — вокруг тестостерона), и вокруг С–ОН-групп — имеющие входы и выходы (прочие системы в приведенных структурах). Функционально они могут отличаться тем, что первые выполняют, в первую очередь, роль фиксации этих молекул, а вторые — обеспечивают взаимосвязь ССИВС.

Стероидные гормоны попадают к клеткам-мишеням через кровь, где они связаны с белками-переносчиками. Вследствие своей липофильной природы они легко пересекают клеточную мембрану путем простой диффузии. Эти гормоны связываются со своими рецепторами, которые обычно образуют комплексы с шапейронами, например, белками теплового шока (Hsp90), которые помогают другим белкам сворачиваться и предотвращать их агрегацию. Среди этих рецепторов имеются также внутрикле-

точные факторы транскрипции, которые могут влиять на степень активности генов. Учитывая их общность, мы не будем детально рассматривать структуру все рецепторов стероидных гормонов, а остановимся лишь на одном характерном примере. Остальные гормоны будут использованы лишь для сравнения.

12.3.3.2. ***Анализ рецептора эстрадиола.*** Предварительно отметим, что упомянутые рецепторы — довольно большие по размеру белки, вследствие чего для кристаллизации и РСА используются, в основном, гормон-связывающие домены. Не является исключением в этом смысле и эстрадиол, для которого известны структуры эстрадиол-связывающих доменов (файлы 1err, 1ere, 1a52, 1gku) [61, 62]. Выбор для анализа именно рецепторов эстрадиола был обусловлен тем, эстрадиол — простейший стероидный гормон (глюкокортикоиды и минералокортикоиды имеют более сложную структуру) и выявленные особенности его взаимодействия с белковым доменом могут быть экстраполированы на другие рецепторы.

На рис. 12.22, *а* показано расположение молекул эстрадиола в структуре димера гормон-связывающего домена. На рисунке видно, что структура доменов содержит в основном α-спирали, причем в обеих субъединицах гормон расположен в эквивалентном положении. Атомы кислорода при C_3 (C_3–O_3H-группы) локализованы в глубине структуры внизу, а при C_{17} (C_{17}–O_{17}H-группы) — в верхней части комплекса. Анализ каждой из субъединиц выявил, что обе C–OH-группы формируют две независимые друг от друга ССИВС, что хорошо видно на рис. 12.22, *б*. В димере ССИВС вокруг C_3–O_3H-групп также являются изолированными друг от друга (см. рис. 12.22, *в*). В то же время, как оказалось, ССИВС вокруг C_{17}–O_{17}H-групп переходят из одной субъединицы в другую и являются взаимосвязанными (см. рис. 12.22, *г*). Их структура слегка отличается от ССИВС, выявленной вокруг C_{17}–O_{17}H-группы одной субъединицы. Обычно такие отличия связаны с тем, что в димере в области контакта субъединиц появляются дополнительные контакты между группами, благодаря которым ССИВС могут продолжиться в другой субъединице. Дальнейший анализ ССИВС подтвердил, что это именно так и есть. На рис. 12.23 показана детальная схема ССИВС, окружающих C–OH-группы эстрадиола в пределах одной субъединице. Анализ двух субъединиц выявил, что HN–C=O-группы Asn 519 обеих субъединиц могут образовать между собой водородную связь (типа NH...N), благодаря чему обе ССИВС, окружающие C_{17}–O_{17}H-группы эстрадиола оказываются взаимосвязанными. При этом появляется ряд дополнительных ССИВС, связанных с C=O-группой Asn 519 (His 516, Arg 515 и др.), которые не выявлялись на одной субъединице. Они расположены симметрично в каждой из субъединиц. Чтобы не усложнять картину, мы эту структуру не приводим.

Следует отметить, что в отличие от ранее рассмотренных структур, в отсутствие лиганда большая часть структуры ССИВС, окружающих C_{17}–O_{17}H группу, остается неизменной, хотя некоторые системы при отсутствии этих групп все же разъединяются.

12.3.3.3. ***Другие рецепторы стероидных гормонов.*** Приведенный пример, разумеется, далеко не исчерпывает всех исследованных к настоящему времени рецепторов стероидных гормонов. Так, в работе [63], файл 1a28, с разрешением 1,8 Å исследована структура рецептора, связывающего прогестерон, относящийся к одновременно к глюкокортикоидам и кортикостероидам. Серия структур, исследованных

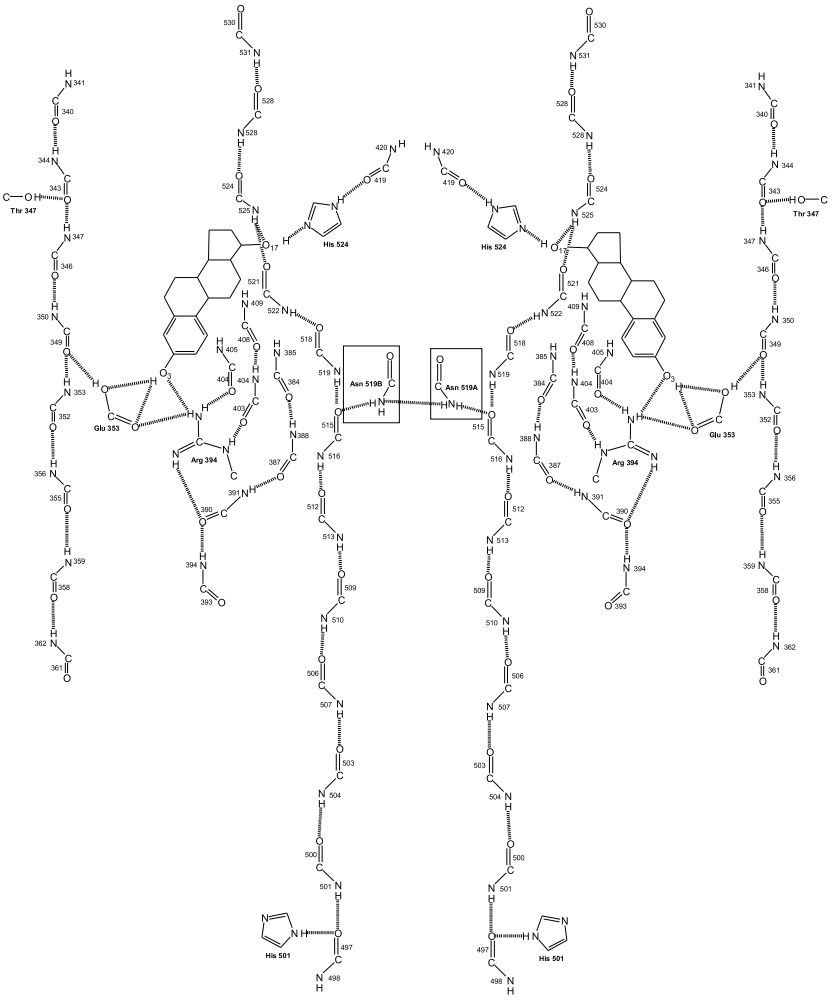


Рис. 12.22. Структура ССИВС эстрадиол-связывающего домена (файл A52) [62], выявляемых в пределах одной субъединицы и взаимосвязь ССИВС двух субъединиц

в работе [64], посвящено анализу связывания различных типов минералокортикоидов (файлы 2aa2 (альдостерон), 2aa5 (прогестерон), 1aa7 (дезоксикортикостерон) и другие). Сравнительному анализу рецептора тестостерона, связанного с его агонистами, посвящена работа [65] (файлы 2ama, 2amb 2am9 и др.). Во всех этих случаях выявляется сходная картина — в глубине рецептора имеется полость, в которую заходит стероидный гормон и функциональные группы, расположенные по разные стороны гормона, включаются в состав протяженных ССИВС, сформированных окружающими спиральными фрагментами белков. Следует отметить, что роль систем водородных связей в связывании минерало-кортикоидов не осталась не замеченной и даже вынесена в заголовок статьи [64]. Однако по настоящему оценить их значимость возможно лишь на основе изложенной в начале главы модели рецепции на основе ССИВС.

Мы не ставили себе задачу рассмотреть все гормоны и медиаторы, участвующие во внутрисистемной регуляции у животных и человека. В то же время, проведенный анализ показал, что исследованные на сегодняшний день структуры рецепторов гормонов и медиаторов в целом подтверждают нашу модель взаимодействия рецептора и лиганда, рассматривающего последний в качестве замыкателя ССИВС, не претерпевающего химические превращения. Осталось рассмотреть последний уровень хемо-информационного обмена — внутриклеточный.

12.4. Внутриклеточные рецепторы

Рецепторы многих гормонов, как мы уже упоминали в разделе 12.3, расположены в структуре клеточных мембран и не проникают в саму клетку. Вместе с тем, сигнал от гормона должен каким-то образом передаваться в клетку и усиливаться. Как было установлено более сорока лет назад Сазерлендом [66], этому способствует циклический аденозинмонофосфат (cAMP, синоним — аденозин-3′,5′-монофосфат). В настоящее время к нему добавился и циклический гуанозинмонофосфат (cGMP) [67]. Вместе они рассматриваются как «вторые посредники» в действии ряда гормонов [3]. Исследованию роли cAMP посвящено огромное количество литературы. Биосинтез этого соединения, осуществляется из ATP ферментом аденилатциклазой, а распад производит фермент фосфодиэстераза [3]. В качестве основного механизма действия cAMP рассматривается активация протеинкиназ, которые и являются его непосредственными акцепторами. Кроме того, для cAMP найдены белки-мишени, осуществляющие активацию генов на ДНК. В качестве модели для изучения этого взаимодействия часто используются клетки E.coli, в которых рецепторы cAMP взаимодействуют с промоторными участками ДНК. Перечисленные выше взаимодействия будут рассмотрены на ряде известных к настоящему времени структур с позиции концепции ССИВС.

12.4.1. Анализ молекул cAMP в составе ССИВС. Как и при анализе сигнальных молекул, проведенном в предыдущих разделах, рассмотрим молекулу cAMP в составе ССИВС. Как показано на рис. 12.24, *в* этой молекуле, являющейся нуклеотидом, можно выделить два блока, вокруг которых формируются ССИВС — блок азотистого основания (адениловый, регуляторный) и блок, объединяющий пятичленный рибозный и шестичленный фосфатный циклы (рибоциклофосфатный, источник заряда), заключенные в прямоугольники. Вокруг аденина возможны ССИВС с двумя входами (на N_6) и тремя выходами (N_2, N_3, N_9). В то же время, вокруг рибоциклофосфатного блока возможны ССИВС вокруг O'_2 остатка рибозы (вход и выход), а также HO–P=O-группы (вход и выход). Не исключены также водородные связи с O'_3 и O'_5, а также O'_4 кислородами рибозы. Ранее, в главах 7 и 10 (разделы 7.2.2.2 и 10.3.2.), было показано, что в олигомерных белках через ССИВС возможна связь между фосфатным блоком одной субъединицы и азотистым основанием (регуляторным блоком) другой субъединицы. Мы предполагаем возможность такой связи и для белков, являющихся рецепторами cAMP (см. рис. 12.24.).

12.4.2. Взаимодействие cAMP с протеинкиназами. Протеинкиназы (ПК) — ферменты, осуществляющие фосфорилирование различных белков (например, ПК мышц), часто состоят из двух субъединиц — регуляторной R (связывающей cAMP) и каталитической — C, которые в неактивном состоянии образуют димерный ком-

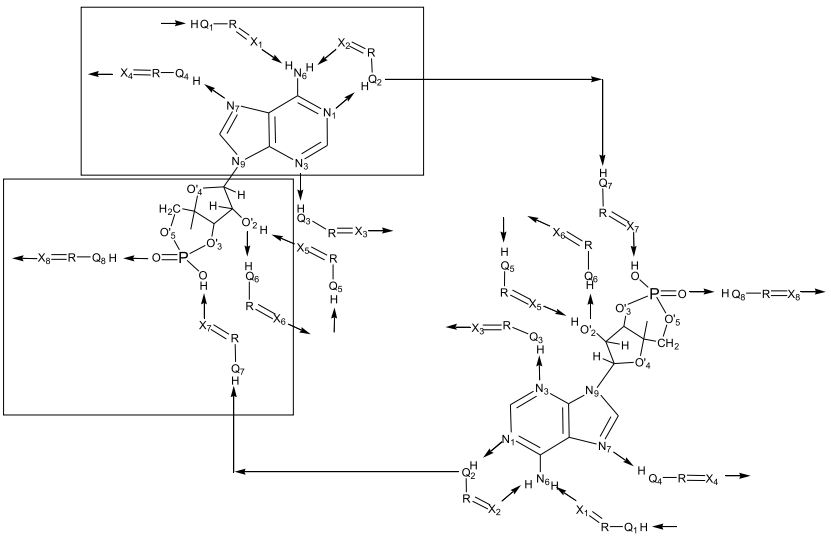


Рис. 12.23. Структура циклического аденозинмонофосфата в составе ССИВС и возможные взаимосвязи блоков в димерных комплексах

плекс R_2C_2[3]. Действие cAMP на ПК состоит в том, что это соединение связывается с регуляторной субъединицей с образованием комплекса R_2, что освобождает субъединицы С и делает их каталитически активными.

К настоящему времени известна структура неактивного комплекса RC, файл 1u7e [68], каталитической субъединицы файл 1j3h [69] и регуляторных субъединиц крысы (тип II-бета)– файл 1cx4 [70], и быка (тип I альфа) — файлы 1ne4, 1ne6 [71], 1rl3 [72]. Естественно, нас интересует характер взаимодействия cAMP с регуляторной субъединицей.

Как оказалось, в зависимости от способа получения (в виде мономера или димера) структура регуляторных субъединиц и характер взаимодействия с cAMP несколько отличаются.

Структура одной регуляторной субъединицы. В работе [71] для исследования характера взаимодействия cAMP с регуляторными субъедтницами ПК были использованы тиоаналоги cAMP - ((Rp)-аденозин 3',5'-cyclic монофосфотиоат и (Sp)-аденозин 3′,5′-cyclic монофосфотиоат). Как видно на рис. 12.25, *а* в структуре одиночной регуляторной субъединицы ПК быка (файл 1ne6), обнаруживается две молекулы тиоаналога cAMP. Азотистые основания этих молекул образуют с белком небольшое количество коротких ССИВС (рис. 12.25, *б*, в прямоугольниках). Эти ССИВС не связывают молекулы ни друг с другом, ни с HO-P=O-группами. В то же время тиофосфатные группы (рис. 12.25, *в*, также в прямоугольниках) молекул тиоаналогов окружают протяженные ССИВС, которые связывают эти группы между собой. Анализ состава ССИВС показывает, что в основном это системы HN–C=O-групп. В частности, на рис. 12.25, *в* хорошо виден фрагмент α-спирали, расположенный посредине между двумя аналогами cAMP. Необходимо также отметить, что C–O′$_2$H-группы рибозы не являются обособленными и входят в состав единых ССИВС, окружающих рибоциклофосфатный блок. На рисунке видно, что в состав ССИВС входят циклические аминокислоты — Trp 260 и Tyr 371. Более

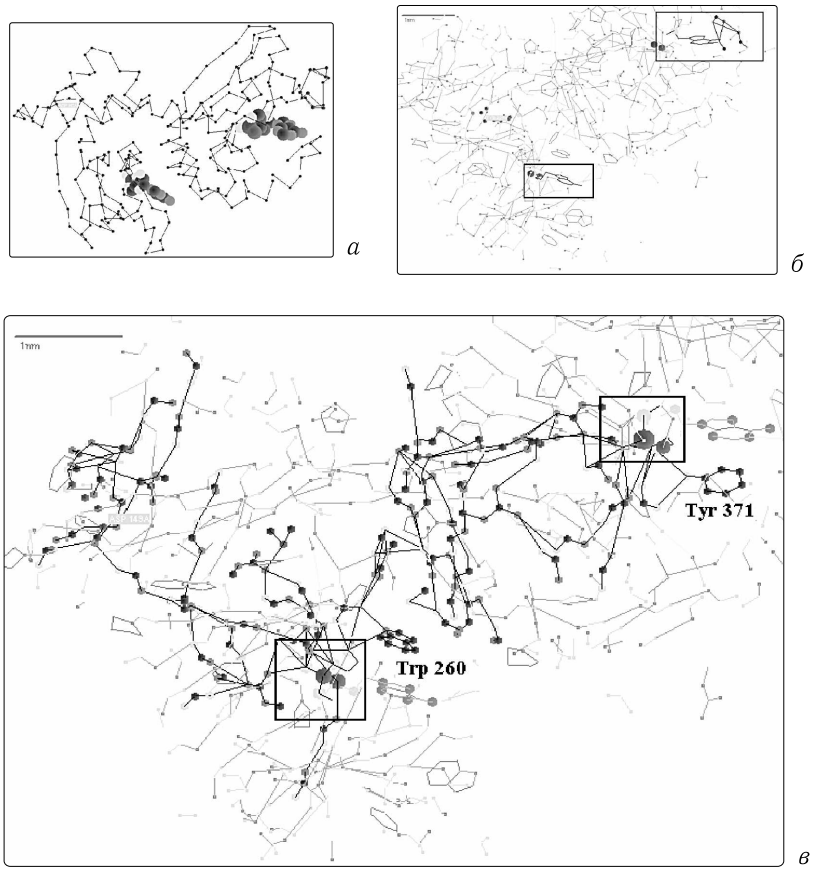


Рис. 12.24. Тиоаналоги циклического аденозинмонофосфата в составе ССИВС регуляторной субъединицы протеинкиназы (файл 1ne6, по данным [71]): *а* — форма представления — α-углеродный скелет; *б* — азотистые основания в составе ССИВС; *в* — взаимосвязь фосфатных групп через ССИВС

детально эта структура представлена на рис. 12.26. Обращает на себя внимание то, что строение ССИВС относительно центрального спирального фрагмента близко к симметричному. Так, слева от спирали расположены Arg 241 и Glu 200, а справа — Arg 352 и Glu 270, с O_2 нижней HO–P=O-группы связаны Arg 209 и Arg 230, а с O_2 верхней HO–P=O-группы — Arg 333 и Arg 350. С O'_2 рибозы нижней молекулы тио-cAMP связана циклическая аминокислота Trp 260, а с O'_2 верхней молекулы — Tyr 371, тоже циклическая и т. д. Симметрия структуры, с позиции нашего подхода, позволяет предполагать, что эта субъединица, состоящая из двух доменов, может функционировать в режиме попеременной работы доменов с участием двух лигандов. То, что в данной структуре не найдена взаимосвязь фосфатного и аденилового блоков разных молекул не исключает возможности взаимосвязи в других функциональных состояниях.

Структура комплекса, состоящего из двух регуляторных субъединиц. В работе [72] авторы использовали вместо cAMP не тиоаналоги, а cGMP. В отличие

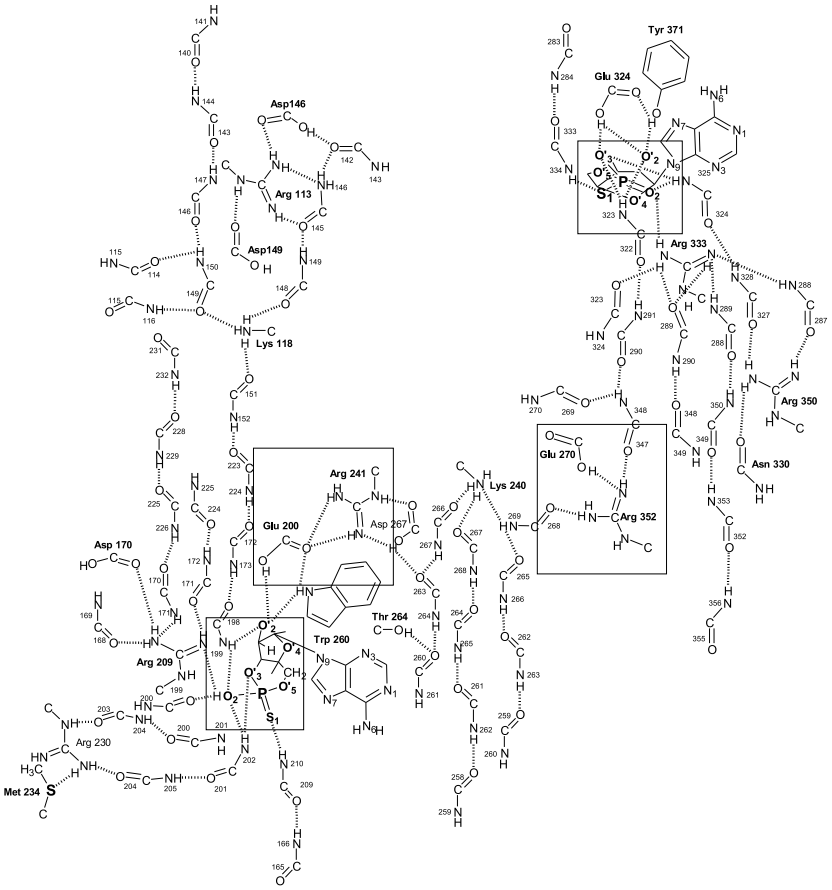


Рис. 12.25. Схема взаимосвязи фосфатных групп двух молекул тио-cAMP регуляторной субъединицы протеинкиназы через ССИВС (файл 1ne6, по [71])

от структуры с одной субъединицей, в димерном комплексе, в каждой субъединице содержится лишь по одной молекуле cGMP (см. рис. 12.26, *а*).

Место вторых молекул cGMP, как оказалось, занимают молекулы глицерина (расположены в нижней части белков, помещены в прямоугольники), который присутствует в кристаллизационном растворе. На рис. 12.27, *б* видно, что молекулы cGMP, находящиеся в разных субъединицах, не связаны между собой через ССИВС. В целом структура ССИВС в субъединицах димера, не смотря на отсутствие второй молекулы cGMP (рис. 12.27, *в*), похожа на структуру из работы [71], хотя между субъединицами имеются некоторые различия.

12.4.3. Циклический AMP как активатор генов. Как мы уже упоминали во введении к данному разделу, для cAMP найдены белки-мишени, осуществляющие активацию генов на ДНК. В качестве модели часто используются клетки E. coli, в которых cAMP-рецепторные белки (ЦРБ) взаимодействуют со специфическими участками ДНК и играют ключевую роль в регуляции генов. Молекулы cAMP

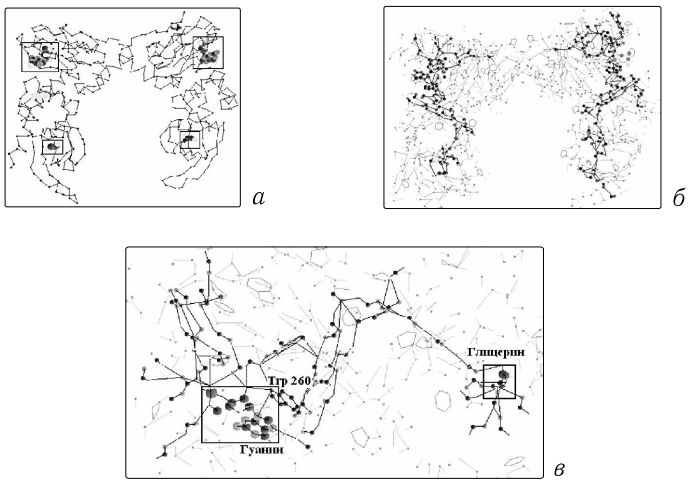


Рис. 12.26. Циклический гуанозинмонофосфат в составе ССИВС димерного комплекса регуляторной субъединицы протеинкиназы (файл 1rl3, по [72]): *а* — положение молекул gAMP в структуре димера (α-углеродный скелет); *б* — отсутствие связи молекул cGMP субъединиц через ССИВС; *в* — структура ССИВС вокруг cGMP и глицерина в одной из субъединиц

рассматриваются как аллостерические регуляторы и при взаимодействии с рецепторными белками проявляют кооперативные эффекты [73].

В настоящее время известно несколько структур ЦРБ, из которых часть исследована в виде димеров, содержащих различное число лигандов (cAMP). Так, в работе [74] (файл 1g6n) изучена структура димера, содержащего две молекулы cAMP (по одной в каждой субъединце). В структуре 1i5z (депонированный файл) найдены три молекулы cAMP (две в одной субъединице и одна — в другой). Известна также структура комплекса димера с ДНК, содержащего по одной молекуле cAMP, [75] (файл 1cgp).

Наиболее подробно мы рассмотрим структуру комплекса cAMP-ЦРБ (рис. 12.28, *а–в*), опубликованную в файле 1i5z, поскольку в нем нашли отражения разнообразные взаимосвязи молекул cAMP через ССИВС. Как видно на рис. 12.28, в изученной структуре димера находится три молекулы cAMP: две из них (1 и 2) — в левой субъединице и одна (3) — в правой. Выделение ССИВС для фосфатной группы молекулы cAMP 1 выявило лишь довольно небольшую связь этих групп с молекулой белка. Остаток аденина молекулы cAMP 2, как оказалось, связан с ССИВС обеих субъединиц. Наиболее интересными нам представляются взаимосвязи через ССИВС молекулы cAMP 3. Для более детального рассмотрения приводим схему ССИВС, построенную на основе этих данных (рис. 12.29).

Из этой схемы следует, что кольцо аденина 3 через Ser 127B связано с кольцом аденина 1, а Arg 82A через фосфатную группу молекулы 2 связан через HO–C=O-группу Glu 72A, Arg 123A, систему HN–C=O-групп α-спирали, с Arg 142A субъединицы A и через симметричную последовательность групп Arg 142 B, систему HN–C=O-групп α-спирали, Arg 123 B, Glu 72 B, и фосфатную группу cAMФ 3 с Arg 82 B — субъединицы B. Определенное сходство такое взаимодействие имеет с рассмотренной выше схемой взаимосвязи фосфатных групп молекул cAMP регуляторной субъединицы протеинкиназы (рис. 12.26).

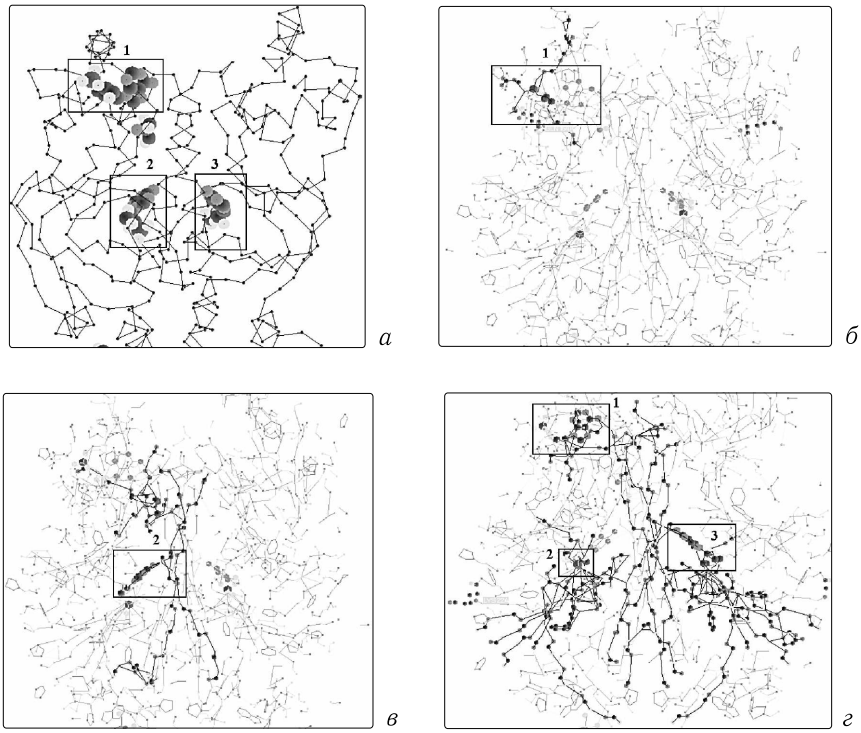


Рис. 12.27. Циклический аденозинмонофосфат в составе ССИВС димерного рецептора — катаболитного активатора генов (файл 1i5z): *а* — положение молекул cAMP в структуре димера (α-углеродный скелет); *б* — связь фосфатной группы молекулы cAMP 1 с ССИВС белка; *в* — связь аденина молекулы cAMP 2 с ССИВС белка; *г* — взаимосвязь аденина молекулы cAMP 1 с фосфатной группой молекулы cAMP 2 и функциональными группами молекулы cAMP 3 через ССИВС

Отметим также, что фосфатные группы молекулы cAMФ 2 и 3 через Arg 142A могут быть связана с аденином 1 молекулы cAMФ 1. Картина взаимодействий молекул cAMФ через ССИВС была бы более наглядной, если бы удалось представить ее в динамике, в процессе переноса зарядов. В настоящей книге это не представляется возможным, однако такой анализ в дальнейшем кажется перспективным.

Сопоставление схемы возможных взаимосвязей cAMФ в составе ССИВС (рис. 12.24.) с данной структурой показывает, что, несмотря на некоторые отличия, связанные с усложнением взаимосвязей cAMФ для двух центров связывания с каждой субъединице димера, принципиально эта схема правильно их предсказывает.

12.5. Обсуждение модели работы хемосенсоров

12.5.1. Краткие итого проведенного обзора литературы. В проведенном обзоре мы сконцентрировали свое внимание на особенностях молекулярных механизмов взаимодействия лигандов со структурой рецепторов. Условное выделение трех информационных уровней (межсистемный, внутрисистемный и внутриклеточный),

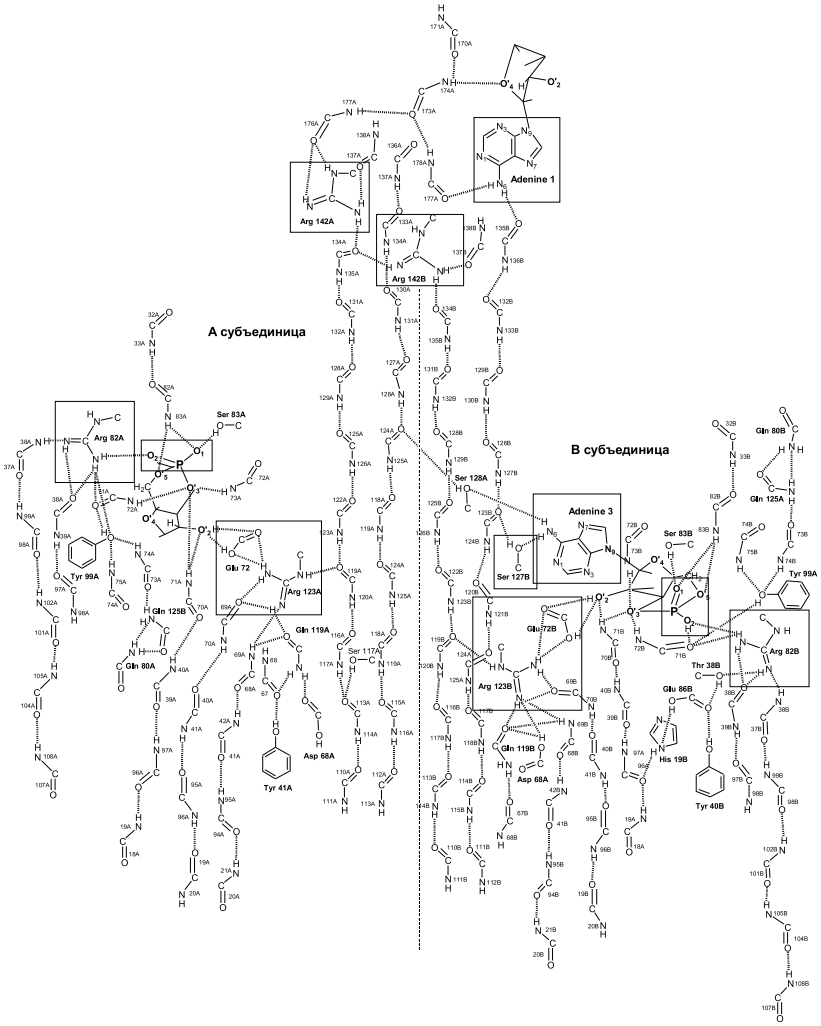


Рис. 12.28. Схема ССИВС молекул циклического аднозинмонофосфата в димерного рецептора — катаболитного активатора генов (файл 1i5z)

который обслуживают рецепторные белки, позволил нам достаточно логично упорядочить все их многообразие. При этом к концу обзора выработалась определенная схема анализа, основанная на использовании концепции ССИВС. Типичными в этом отношении являются медиаторы (раздел 12.1.1.), нейропептиды (раздел 12.3.1.2.), гормоны щитовидной железы (раздел 12.3.2.), стероидные гормоны (раздел 12.3.3.1.) и молекулы цАМФ (раздел 12.4.1). Сначала молекулы гормона или медиатора анализируются в качестве возможного замыкателя ССИВС, отыскиваются те или иные группы, подходящие для этих целей. Затем с помощью программы Protein 3D проводился анализ структуры рецепторных белков, содержащих, по возможности, нативный лиганд (аналоги лигандов не всегда сохраняют правильный механизм такого взаимодействия). Выделяемые программой ССИВС, связанные с лигандом,

воспроизводились далее в книге, как в виде экранных изображений, так и построенных на их основе схем ССИВС, окружающих лиганды.

На основе проведенного анализа можно сделать следующие общие выводы.

1. Все рецепторные белки являются, как правило, олигомерами и состоят из двух и более субъединиц.

2. Во всех рецепторах имеются специфические полости, доступные для проникновения лигандов.

3. Связывание функциональных групп лигандов с рецептором осуществляется через полярные группы белков, как правило, связанные в ССИВС. При этом функциональные группы включаются в структуру ССИВС рецептора.

4. Центры связывания лигандов, расположенные в разных субъединицах часто бывают не изолированы между собой, а связаны через ССИВС.

Все эти моменты, как мы видели, описываются в нашей модели работы сенсора (раздел 12.1.2.). Следствием, вытекающим из нашей моделью, является отрицательная кооперативность в работе рецепторных белков и поочередный (флип-флоп) механизм их функционирования. Структура рецепторов цAMP и взаимодействие с ней молекул цAMP, рассмотренные в разделе 12.4.3, вполне могут быть проанализированы на основе нашей модели. Однако для детального анализа необходимо получение нескольких структур, находящихся в разных функциональных состояниях. Не случайно, вероятно, что именно на этих белках активно изучаются механизмы аллостерической регуляции и отрицательной кооперативности [69–76]. Отметим, что идея кооперативности половины от числа связывающих центр (half-of-the-sites cooperativity), на основе проявления отрицательной кооперативности рецепторных белков уже высказывалась в литературе [77], хотя до поочередного («флип-флоп») механизма в работе хеморецепторов она не «дотянула».

С позиции нашего подхода эти процессы, также как и в случае с ферментами (см. раздел 10.1.3), объясняются на основе замыкания ССИВС молекулами, не претерпевающими химического превращения. В этом смысле хеморецепторы аналогичны ферментам, однако для ферментов аллостерия носит временный характер и при последующем переключении регулятор часто становится молекулой субстрата, тогда как для хеморецепторов этого не происходит. Необходимость же поочередного механизма связывания лигандов в работе рецепторов вытекает из требований общего механизма переноса зарядов по ССИВС.

Следует отметить, что в настоящее время имеются многочисленные обзоры (для примера, см. [78]), в которых рассматриваются проблемы передачи сигналов между рецепторами на мембранном уровне. При этом предполагается, что исторически сложившиеся представления о том, что рецептор является минимальной единицей для распознавания лекарств и единицей активности, должно быть заменены на идеи о существовании мозаики рецепторов, участвующих в кооперативных взаимодействиях друг с другом. Развиваемые нами представления и непрерывных ССИВС, переходящих от одной молекулы белка к другой, а также обоснованный в нашей модели механизм поочередной работы субъединиц рецепторов могут служить существенным дополнением к этим представлениям.

12.5.2. G-белки как возможные источники зарядов. Как следует из проведенного обзора, идея замыкания ССИВС лигадами находит полное подтверждение в проанализированных нами структурных данных. Однако наша модель включает

не только ССИВС и их замыкание лигандами, не претерпевающими химических превращений, но и требует наличия доноров и акцепторов зарядов. Эти элементы модели нами практически не рассматривались, да и в литературе пока они тоже слабо находят отражение. Однако, если вопрос об акцепторах зарядов, переносимых по ССИВС после их замыкания, связан с тем объектом, в регуляции которого участвует рецепторный белок и требует анализа для каждого конкретного случая, что выходит далеко за рамки нашей книги, то в случае доноров зарядов вопрос заслуживает внимания и вполне может быть рассмотрен.

В процессе изложения мы неоднократно упоминали о том, что тот или иной рецептор относится к группе белков, зависимых от G-протеинов. Например, вкусовые клетки содержат связанные с G-белками рецепторы (раздел 12.2.2), рецепторы глютамата (раздел 12.3.1.1.), эндофинов и энкефалинов (раздел 12.3.1.2) и ряд других. В современной литературе имеется большое число обзоров, посвященных этим вопросам [79–83]. Обычно суперсемейство G-протеин зависимых белков подразделяют на несколько больших семейств — семейство «родопсино-подобных» белков (семейство A), включающих родопсин, β_2 — адренорецепторы и др., небольшое семейство, содержащее рецепторы коротких пептидов — глюкагона и секретина (семейство B) и «метаботрофное» семейство, включающее рецепторы глютамата, γ-аминомасляной кислоты, кальция и т. д. (семейство C) [83]. Как правило, эти рецепторы ассоциируются с гетеро-тримерными G —белками. Примером такого белка является α-трансдуцин (файл 1TAD) [84], в котором две субъединицы находятся в одном состоянии, а третья — в другом. Мы уже не раз упоминали и рассматривали структуру GTP-связывающего центра таких белков (см., например, раздел 7.2.2.2, рис. 7.9).

При образовании комплекса между G-белком и рецептором, в G-белке может происходить гидролиз фосфодиэфирной связи GTP, который сопровождается появлением свободного электрона. Этот заряд данная структура может воспринимать и передавать далее по ССИВС тому рецептору, с которым связан G-белок. К сожалению, в настоящее время, хотя нам и известны такие комплексы (например, файл 1omw [85]), однако в структуре отсутствуют как ГТФ, так и лиганд, так что проследить какой-либо путь сигнала пока не представляется возможным.

Таким образом, в рамках нашей модели факт зависимости многих рецепторов от G-белков находит простое и логичное объяснение. С позиции нашей модели G-белки являются универсальными блоками, присоединение которых обеспечивает рецепторы необходимыми зарядами, проходящими по ССИВС к регулируемой рецепторами области после замыкания разрывов ССИВС лигандами.

12.5.3. Возможные рекомендации конструктору хемосенсорных структур. Совокупность приведенных данных показывает, что сформулированная в начале этой главы модель хеморецепции вполне адекватно отражает реальную ситуацию в хаморецепции. Это позволяет нам, учитывая применявшиеся в процессе изложения общие подходы, основанные на концепции ССИВС, сформулировать ряд исходных положений, которыми можно пользоваться при получении задачи на разработку хемосенсора.

1. Установить химическую структуру молекулы, на которую необходимо создать хемосенсор.

2. Все функциональные группы этой молекулы, способные к образованию водородных связей, представить в качестве функциональных элементов ССИВС.

3. Выбрать вариант олигомера (например, димер, тример, пентамер и т. д.), на базе которого будет создаваться рецептор.

4. Проложить ряд ССИВС, связывающих молекулы лиганда в олигомере.

5. Выбрать один из типов белков (например, G-белок), который будет обеспечивать рецептор зарядами и проложить ССИВС от активного центра этого белка к функциональных группам лиганда.

6. Уяснить, для какой цели разрабатывается рецептор и по возможности представить структуру акцептора заряда.

7. Связать области конечных акцепторов зарядов в ССИВС рецепторов.

Разумеется, этих общих положений недостаточно для полной разработки хемосенсорных структур. Этому будет способствовать использование более конкретных методов типа модели топологического кодирования цепных полимеров (гл. 8). Однако сформулированные рекомендации, на наш взгляд, помогут исследователю сразу избежать грубых ошибок при их разработке на первом, наиболее ответственном этапе.

Литература к главе 12

1. *Карасев В.А.*, *Лучинин В.В.*, *Стефанов В.Е.* Как построить биочип? // Биотехнология. 1993. № 2. С. 3–15.
2. *Karasev V.A.*, *Luchinin V.V.*, *Stefanov V.E.* A Model of Molecular Electronics Based on the Concept of Conjugated Ionic-Hydrogen Bond Systems // Adv. Mater. Opt. Electron. 1994. V. 4. P. 203–218.
3. *Страйер Л.* Биохимия. В 3-х томах / Пер. с англ. — М.: Мир, 1984. 1985. Т. 2. — 308 с.; 1985. Т. 3. — 397 с.
4. *Карасев В.А.*, *Лучинин В.В.* Молекулярная архитектура органических сенсорных наносистем // Петербург. ж. электроники. 2001. № 4. С. 12–32.
5. *Карасев В.А.*, *Лучинин В.В.* Проблемы создания искусственных бионических микро- и наносистем // Известия вузов. Электроника. 1998. № 5. С. 53–68.
6. *Ferguson A.D. Braun V.*, *Fiedler H.P.*, *Coulton J.W.*, *Diederichs K.*, *Welte W.* Crystal structure of the antibiotic albomycin in complex with the outer membrane transporter FhuA // Protein Sci. 2000. V. 9. P. 956–963.
7. *Henke J.M.*, *Bassler B.L.* Bacterial social engagements // Trends Cell Biol. 2004. V. 14. P. 648–656.
8. *Raffa R.B.*, *Iannuzzo J.R.*, *Levine D.R.*, *Saeid K.K.*, *Schwartz R.C.*, *Sucic N.T.*, *Terleckyj O.D.*, *Young J.M.* Bacterial communication («quorum sensing») via ligands and receptors: a novel pharmacologic target for the design of antibiotic drugs // J. Pharmacol. Exp. Ther. 2005. V. 312. P. 417–423.
9. *Keller L.*, *Surette M.G.* Communication in bacteria: an ecological and evolutionary perspective // Nat. Rev. Microbiol. 2006. V. 4. P. 249–258.
10. *Camilli A.*, *Bassler B.L.* Bacterial small-molecule signaling pathways // Science. 2006. V. 311. P. 1113–1116.
11. *Waters C.M.*, *Bassler B.L.* Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria // Annu. Rev. Cell. Dev. Biol. 2005. V. 21. P. 319–346.
12. *Natsume R.*, *Ohnishi Y.*, *Senda T.*, *Horinouchi S.* Crystal structure of a gamma-butyrolactone autoregulator receptor protein in Streptomyces coelicolor A3(2) // J. Mol. Biol. 2004. V. 336. P. 409–419.
13. *Walters M.*, *Sperandio V.* Quorum sensing in Escherichia coli and Salmonella // Int. J. Med. Microbiol. 2006. V. 296. P. 125–131.
14. *Abraham W.R.* Controlling biofilms of gram-positive pathogenic bacteria // Curr. Med. Chem. 2006. V. 13. P. 1509–1524.
15. *Milton D.L.* Quorum sensing in vibrios: complexity for diversification // Int. J. Med. Microbiol. 2006. V. 296. P. 61–71.
16. *Kong K.F.*, *Vuong C.*, *Otto M.* Staphylococcus quorum sensing in biofilm formation and infection // Int. J. Med. Microbiol. 2006. V. 296. P. 133–139.
17. *Schuster M.*, *Greenberg E.P.* A network of networks: quorum-sensing gene regulation in Pseudomonas aeruginosa // Int. J. Med. Microbiol. 2006. V. 296. P. 73–81.
18. *Mombaerts P.* Molecular biology of odorant receptors in vertebrates // Ann. Rev. Neurosci. 1999. V. 22. P. 487–509.

19. *Matsunami H.*, *Amrein H.* Taste and pheromone perception in mammals and flies // Genome Biol. 2003. V. 4. P. 220–230.
20. *Breer H.* Olfactory receptors: molecular basis for recognition and discrimination of odors // Anal. Bioanal. Chem. 2003. V. 377. P. 427–433.
21. *Tegoni M.*, *Campanacci V.*, *Cambillau C.* Structural aspects of sexual attraction and chemical communication in insects // Trends Biochem. Sci. 2004. V. 29. P. 257–264.
22. *Dahanukar A.*, *Hallem E.A.*, *Carlson J.R.* Insect chemoreception // Curr. Opin. Neurobiol. 2005. V. 15. P. 423–430.
23. *Tegoni M.*, *Pelosi P.*, *Vincent F.*, *Spinelli S.*, *Campanacci V.*, *Grolli S.*, *Ramoni R.*, *Cambillau C.* Mammalian odorant binding proteins // Biochim. Biophys. Acta. 2000. V. 1482. P. 229–240.
24. *Bianchet M.A.*, *Bains G.*, *Pelosi P.*, *Pevsner J.*, *Snyder S.H.*, *Monaco H.L.*, *Amzel L.M.* The three-dimensional structure of bovine odorant binding protein and its mechanism of odor recognition // Nat. Struct. Biol. 1996. V. 3. P. 934–939.
25. *Ramoni R.*, *Vincent F.*, *Grolli S.*, *Conti V.*, *Malosse C.*, *Boyer F.D.* Nagnan- Le Meillour P., Spinelli S., Cambillau C., Tegoni M. The insect attractant 1-octen-3-ol is the natural ligand of bovine odorant-binding protein // J. Biol. Chem. 2001. V. 276. P. 7150–7155.
26. *Vincent F.*, *Ramoni R.*, *Spinelli S.*, *Grolli S.*, *Tegoni M.*, *Cambillau C.* Crystal structures of bovine odorant-binding protein in complex with odorant molecules // Eur. J. Biochem. 2004. V. 271. P. 3832–3842.
27. *Vincent F.*, *Spinelli S.*, *Ramoni R.*, *Grolli S.*, *Pelosi P.*, *Cambillau C.*, *Tegoni M.* Complexes of porcine odorant binding protein with odorant molecules belonging to different chemical classes // J. Mol. Biol. 2000. V. 300. P. 127–139.
28. *Sandler B.H.*, *Nikonova L.*, *Leal W.S.*, *Clardy J.* Sexual attraction in the silkworm moth: structure of the pheromone-binding-protein-bombykol complex // Chem. Biol. 2000. V. 7. P. 143–151.
29. *Kruse S.W.*, *Zhao R.*, *Smith D.P.*, *Jones D.N.* Structure of a specific alcohol-binding site defined by the odorant binding protein LUSH from Drosophila melanogaster // Nat. Struct. Biol. 2003. V. 10. P. 694–700.
30. *Lartigue A.*, *Gruez A.*, *Spinelli S.*, *Riviere S.*, *Brossut R.*, *Tegoni M.*, *Cambillau C.* The crystal structure of a cockroach pheromone-binding protein suggests a new ligand binding and release mechanism // J. Biol. Chem. 2003. V. 278. P. 30213–30218.
31. *Lartigue A.*, *Gruez A.*, *Briand L.*, *Blon F.*, *Bezirard V.*, *Walsh M.*, *Pernollet J.C.*, *Tegoni M.*, *Cambillau C.* Sulfur-SAD crystal structure of a pheromone binding protein from the honeybee Apis mellifera L // J. Biol. Chem. 2004. V. 279. P. 4459–4464.
32. *Pelosi P.*, *Zhou J.J.*, *Ban L.P.*, *Calvello M.* Soluble proteins in insect chemical communication // Cell. Mol. Life Sci. 2006. V. 63. P. 1658–1676.
33. *Campanacci V.*, *Lartigue A.*, *Hallberg B.M.*, *Jones T.A.*, *Giudici-Orticoni M.T.*, *Tegoni M.*, *Cambillau C.* Moth chemosensory protein exhibits drastic conformational changes and cooperativity on ligand binding // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2003. V. 100. P. 5069–5074.
34. *Meyerhof W.* Elucidation of mammalian bitter taste // Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. 2005. V. 154. P. 37–72.
35. *Drayna D.* Human taste genetics // Annu. Rev. Genomics Hum. Genet. 2005. V. 6. P. 217–235.
36. *Wooding S.* Evolution: a study in bad taste? // Curr. Biol. 2005. V. 15. P. R805-807.
37. *Reed D.R.*, *Tanaka T.*, *McDaniel A.H.* Diverse tastes: Genetics of sweet and bitter perception // Physiol. Behav. 2006. V. 88. P. 215–226.
38. *Scott K.* Taste recognition: food for thought // Neuron. 2005. V. 48. P. 455–464.
39. *Mohr K.*, *Trankle C.*, *Holzgrabe U.* Structure / activity relationships of M2 muscarinic allosteric modulators // Receptors Channels. 2003. V. 9. P. 229–240.

40. *Birdsall N.J.*, *Lazareno S.* Allosterism at muscarinic receptors: ligands and mechanisms // Mini Rev. Med. Chem. 2005. V. 5. P. 523–543.
41. *Wess J.* Allosteric binding sites on muscarinic acetylcholine receptors // Mol. Pharmacol. 2005. V. 68. P. 1506–1509.
42. *Brejc K.*, *van Dijk W.J.*, *Klaassen R.V.*, *Schuurmans M.*, *van Der Oost J.*, *Smit A.B.*, *Sixma T.K.* Crystal structure of an ACh-binding protein reveals the ligand-binding domain of nicotinic receptors // Nature. 2001. V. 411. P. 269–276.
43. *Celie P.H.*, *van Rossum-Fikkert S.E.*, *van Dijk W.J.*, *Brejc K.*, *Smit A.B.*, *Sixma T.K.* Nicotine and carbamylcholine binding to nicotinic acetylcholine receptors as studied in AChBP crystal structures // Neuron. 2004. V. 41. P. 907–914.
44. *Bourne Y.*, *Talley T.T.*, *Hansen S.B.*, *Taylor P.*, *Marchot P.* Crystal structure of a Cbtx-AChBP complex reveals essential interactions between snake alpha-neurotoxins and nicotinic receptors // EMBO J. 2005. V. 24. P. 1512–1522.
45. *Ulens C.*, *Hogg R.C.*, *Celie P.H.*, *Bertrand D.*, *Tsetlin V.*, *Smit A.B.*, *Sixma T.K.* Structural determinants of selective alpha-conotoxin binding to a nicotinic acetylcholine receptor homolog AChBP // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2006. V. 103. P. 3615–3620.
46. *Chen P.E.*, *Wyllie D.J.A.* Pharmacological insights obtained from structure–function studies of ionotropic glutamate receptors // Brit. J. Pharmacol. 2006. V. 147. P. 839–853.
47. *Furukawa H.*, *Gouaux E.* Mechanisms of activation, inhibition and specificity: crystal structures of the NMDA receptor NR1 ligand-binding core // EMBO J. 2003. V. 22. P. 2873–2885.
48. *Furukawa H.*, *Singh S.K.*, *Mancusso R.*, *Gouaux E.* Subunit arrangement and function in NMDA receptors // Nature. 2005. V. 438. P. 185–192.
49. *Paesen G.C.*, *Adams P.L.*, *Harlos K.*, *Nuttall P.A.*, *Stuart D.I.* Tick histamine-binding proteins: isolation, cloning, and three-dimensional structure // Mol. Cell. 1999. V. 3. P. 661–671.
50. *Hughes J.*, *Smith T.W.*, *Kosterlitz H.W.*, *Fothergill L.A.*, *Morgan B.A.*, *Morris H.R.* Identification of two related peptides from the brain with potent opiate agonist activity // Nature. 1975. V. 258. P. 577–579.
51. *Corbett A.D.*, *Henderson G.*, *McKnight A.T.*, *Paterson S.J.* 75 years of opioid research: the exciting but vain quest for the Holy Grail // Brit. J. Pharmac. 2006. V. 147. S. 153–S162.
52. *de Vos A.M.*, *Ultsch M.*, *Kossiakoff A.A.* Human growth hormone and extracellular domain of its receptor: crystal structure of the complex // Science. 1992. V. 255. P. 306–312.
53. *Clackson T.*, *Ultsch M.H.*, *Wells J.A.*, *de Vos A.M.* Structural and functional analysis of the 1:1 growth hormone: receptor complex reveals the molecular basis for receptor affinity // J. Mol. Biol. 1998. V. 277. P. 1111–1128.
54. *Sundstrom M.*, *Lundqvist T.*, *Rodin J.*, *Giebel L.B.*, *Milligan D.*, *Norstedt G.* Crystal structure of an antagonist mutant of human growth hormone, G120R, in complex with its receptor at 2.9 A resolution // J. Biol. Chem. 1996. V. 271. P. 32197–32203.
55. *Brown R.J.*, *Adams J.J.*, *Pelekanos R.A.*, *Wan Y.*, *McKinstry W.J.*, *Palethorpe K.*, *Seeber R.M.*, *Monks T.A.*, *Eidne K.A.*, *Parker M.W.*, *Waters M.J.* Model for growth hormone receptor activation based on subunit rotation within a receptor dimmer // Nat. Struct. Mol. Biol. 2005. V. 12. P. 814–821.
56. *Fox K.M.*, *Dias J.A.*, *Van Roey P.* Three-dimensional structure of human follicle-stimulating hormone // Mol. Endocrinol. 2001. V. 15. P. 378–389.
57. *Fan Q.R.*, *Hendrickson W.A.* Structure of human follicle-stimulating hormone in complex with its receptor // Nature. 2005. V. 433. P. 269–277.
58. *Скулачев В.П.* Энергетика биологических мембран. — М.: Наука, 1989. — 564 с.
59. *Sandler B.*, *Webb P.*, *Apriletti J.W.*, *Huber B.R.*, *Togashi M.* Cunha Lima S.T., Juric S., Nilsson S., Wagner R., Fletterick R.J., Baxter J.D. Thyroxine-thyroid hormone receptor interactions // J. Biol. Chem. 2004. V. 279. P. 55801–55808.

60. *Beato M.*, *Klug J.* Steroid hormone receptors: an update // Hum. Reprod. Update. 2000. V. 6. P. 225–236.

61. *Brzozowski A.M.*, *Pike A.C. W.*, *Dauter Z.*, *Hubbard R.E.*, *Bonn T.*, *Engstrom O.*, *Ohman L.*, *Greene G.L.*, *Gustaffson J.-A.*, *Carlquist M.* Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor // Nature. 1997. V. 389. P. 753–758.

62. *Tanenbaum D.M.*, *Wang Y.*, *Williams S.P.*, *Sigler P.B.* Crystallographic comparison of the estrogen and progesterone receptor's ligand binding domains // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1998. V. 95. P. 5998–6003.

63. *Williams S.P.*, *Sigler P.B.* Atomic structure of progesterone complexed with its receptor // Nature. 1998. V. 393. P. 392–396.

64. *Bledsoe R.K.*, *Madauss K.P.*, *Holt J.A.*, *Apolito C.J.*, *Lambert M.H.*, *Pearce K.H.*, *Stanley T.B.*, *Stewart E.L.*, *Trump R.P.*, *Willson T.M.*, *Williams S.P.* A ligand-mediated hydrogen bond network required for the activation of the mineralocorticoid receptor // J. Biol. Chem. 2005. V. 280. P. 31283–31293.

65. *Pereira de Jesus-Tran K.*, *Cote P.L.*, *Cantin L.*, *Blanchet J.*, *Labrie F.*, *Breton R.* Comparison of crystal structures of human androgen receptor ligand-binding domain complexed with various agonists reveals molecular determinants responsible for binding affinity // Protein Sci. 2006. V. 15. P. 987–999.

66. *Sutherland E.W.* Studies on the mechanism hormone action // Science. 1972. V. 177. P. 401–408.

67. *Ho Y.S.*, *Burden L.M.*, *Hurley J.H.* Structure of the GAF domain, a ubiquitous signaling motif and a new class of cyclic GMP receptor // EMBO J. 2000. V. 19. P. 5288–5299.

68. *Kim C.*, *Xuong N.-H.*, *Taylor S.S.* Crystal structure of a complex between the catalytic and regulatory (RIalpha) subunits of PKA // Science. 2005. V. 307. P. 690–606.

69. *Akamine P.* Madhusudan, Wu J., Xuong N.-H., Ten Eyck L. F., Taylor S. S. Dynamic features of cAMP-dependent protein kinase revealed by apoenzyme crystal structure // J. Mol. Biol. 2003. V. 327. P. 159–171.

70. *Diller T.C.* Madhusudan, Xuong N. H., Taylor S. S. Molecular basis for regulatory subunit diversity in cAMP-dependent protein kinase: crystal structure of the type II beta-regulatory subunit // Structure. 2001. V. 9. P. 73–82.

71. *Wu J.*, *Jones J.M.*, *Xuong N.H.*, *Eyck L.F.*, *Taylor S.S.* Crystal structures of RIalpha subunit of cyclic adenosine 5'-monophosphate (cAMP)-dependent protein kinase complexed with (Rp)-adenosine 3',5'-cyclic monophosphothioate and (Sp)-adenosine 3',5'-cyclic monophosphothioate, the phosphothioate analogues of cAMP // Biochemistry. 2004. V. 43. P. 6620–6629.

72. *Wu J.*, *Brown S.*, *Xuong N.-H.*, *Taylor S.S.* RIa subunit of PKA: a cAMP-free structure reveals a hydrophobic capping mechanism for docking cAMP into site b. Structure. 2004. V. 12. P. 1056–1065.

73. *Won H.S.*, *Yamazaki T.*, *Lee T.W.*, *Yoon M.K.*, *Park S.H.*, *Kyogoku Y.*, *Lee B.J.* Structural understanding of the allosteric conformational change of cyclic AMP receptor protein by cyclic AMP binding // Biochemistry. 2000. V. 39. P. 13953–13962.

74. *Passner J.M.*, *Schultz S.C.*, *Steitz T.A.* Modeling the cAMP-induced allosteric transition using the crystal structure of CAP-cAMP at 2.1 A resolution // J. Mol. Biol. 2000. V. 304. P. 847–859.

75. *Schultz S.C.*, *Shields G.C.*, *Steitz T.A.* Crystal structure of a CAP-DNA complex: the DNA is bent by 90 degrees // Science. 1991. V. 253. P. 1001–1007.

76. *Harman J.G.* Allosteric regulation of the cAMP receptor protein // Biochim. Biophys. Acta. 2001. V. 1547. P. 1–17.

77. *Biemann H.P.* Koshland D.E.Jr. Aspartate receptors of Escherichia coli and Salmonella typhimurium bind ligand with negative and half-of-the-sites cooperativity // Biochemistry. 1994. V. 33. P. 629–634.
78. *Agnati L.F.*, *Fuxe K.*, *Ferré S.* How receptor mosaics decode transmitter signals. Possible relevance of cooperativity // Trends Biochem. Sci. 2005. V. 30. P. 188–193.
79. *Albert P.R.*, *Robillard L.* G protein specificity: traffic direction required // Cell Signal. 2002. V. 14. P. 407–418.
80. *Brady A.E.*, *Limbird L.E.* G protein-coupled receptor interacting proteins: emerging roles in localization and signal transduction // Cell Signal. 2002. V. 14. P. 297–309.
81. *Kreienkamp H.J.* Organisation of G-protein-coupled receptor signalling complexes by scaffolding proteins // Curr. Opin. Pharmacol. 2002. V. 2. P. 581–586.
82. *Milligan G.*, *White J.H.* Protein-protein interactions at G-protein-coupled receptors // Trends Pharmacol. Sci. 2001. V. 22. P. 513–518.
83. *Jensen A.A.*, *Spalding T.A.* Allosteric modulation of G-protein coupled receptors // Eur. J. Pharm. Sci. 2004. V. 21. P. 407–420.
84. *Sondek J.*, *Lambright D.G.*, *Noel J.P.*, *Hamm H.E.*, *Sigler P.B.* GTP-ase mechanism of G-proteins from the 1.7-angstrom crystal structure of transducin alpha-Gdp-Alf4 // Nature. 1994. V. 372. P. 276–279.
85. *Lodowski D.T.*, *Pitcher J.A.*, *Capel W.D.*, *Lefkowitz R.J.*, *Tesmer J.J.G.* Keeping G proteins at bay: a complex between G protein-coupled receptor kinase 2 and G-beta-gamma // Science. 2003. V. 300. P. 1256–1262.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Перечислим кратко основные положения, обсуждавшиеся в нашей книге. Анализ понятий «биоэлектроника», «надмолекулярные биоструктуры», «биосреды», «бионика» вывел нас к рассмотрению материаловедческого базиса бионических микро- и наносистем. Такие свойства, как структурно-энергетическая стабильность и вариабельность, пространственно-временной полиморфизм, наличие встроенных источников энергии и зарядов, сверхсенсорность и селективность, а также матричный характер структурно-функциональной организации обеспечивают перспективность биоструктур как технических материалов. Основным этапом при переходе от планарной технологии синтеза микросхем к их самоорганизации является замена комплекта шаблонов единым N-шаблоном. При этом должен быть осуществлен переход к топологически-временной развертке технологического процесса путем проектирования ее как цепи ячеек из ν элементов. Однако в микроэлектронике эта идея так и не была реализована. Очевидная связь этого подхода с биосинтезом белков, а также такими свойствами биосистем как матричное копирование, кодирование и ряд других, намечает контуры новой парадигмы — системы бионической наноэлектроники. К фрагментам этой системы, реализованной в биоструктурах, можно отнести и развернутую в данной книге концепцию систем сопряженных ионно-водородных связей (концепцию ССИВС).

Изложению концепции предшествует предварительное ознакомление и подробный анализ существующих представлений об организации биоструктур и механизмах переноса зарядов в них. Как известно, всякое построение системы теоретического знания базируется на введении и анализе ряда элементарных понятий и принципов, которые далее рассматриваются как аксиомы. Не является исключением в этом отношении и концепция ССИВС, построенная по принципу «перевернутой пирамиды». Элементарными в ней являются понятия простой (R–Z) и резонансной группы (Q–R=X) — два типа сочетаний связей из атомов элементов органогенов (C, N, O, P, S), встречающиеся в биоструктурах и биомолекулах. Предложенная на основе этих понятий классификация групп, найденных в биоструктурах, включающая 5 простых и 15 резонансных групп, может служить важным критерием первичного отбора пригодности тех или иных молекул для использования в бионической наноэлектронике.

Взаимодействие простых и резонансных групп через атом водорода приводит к построению систем, состоящих из чередующихся резонансных и простых групп, связанных водородными связями, которые были охарактеризованы как определенный класс надмолекулярных систем и получили наименование «системы сопряженных ионно-водородных связей» (ССИВС).

Подстановка в эти системы групп из классификационной таблицы и далее, конкретных биомолекул, имеющих подобные группы, позволяет строить структуры, содержащие непрерывные ССИВС. Таким образом, суть «перевернутой пирамиды» состоит в том, что от элементарных понятий через классификацию групп и конкретные биомолекулы и биоструктуры мы переходим к бесконечному многообразию ССИВС,

которые могут быть сконструированы из биомолекул и биоструктур в соответствии с поставленными техническими задачами.

Формализованный характер развитых представлений позволил показать универсальный характер ССИВС в надмолекулярных структурах и разработать и модель переноса зарядов по ССИВС. Основными условиями реализации этой модели в надмолекулярных структурах являются асимметрия атомов водорода в ССИВС, изоляция ССИВС от внешней среды, доступность к ССИВС молекул доноров и акцепторов зарядов, а также термодинамическая обратимость процессов прямого и обратного переноса зарядов по ССИВС. Последнее условие обеспечивается за счет симметрии структур. Из двух возможных типов симметрии — зеркальной и поворотной, именно поворотная оказывается наиболее подходящей для практической реализации, поскольку обеспечивается одним механизмом матричного синтеза структур. Таким образом, в рамках предложенной модели переноса зарядов по ССИВС решается, с одной стороны, проблема природы олигомерной организации биоструктур, а с другой стороны — предопределяется, какими должны быть бионические наноструктуры. Вывод однозначен: это должны быть олигомерные структуры, обладающие симметрией и содержащие в основе построения ССИВС.

Другим важным следствием этой модели является колебательный механизм работы нанобиоструктур, т. е. активные центры и места связывания в них должны работать поочередно. На основе принятого механизма находят объяснение модели поочередного функционирования различных типов биоструктур, включая гены, ферменты и хемосенсоры.

Введение представления о входах (атомах водорода) и выходах (неподеленных парах электронов) в функциональных группах, также вытекающего из этой модели, привело к формированию взгляда на биоструктуры как на системы бионической наноэлектроники, состоящие из базовой архитектуры и базовых элементов. С позиции формирования базовой архитектуры нами проанализированы белки, нуклеиновые кислоты и фосфолипиды, а в качестве базовых элементов — основные классы биомолекул (аминокислоты, азотистые основания, хиноны, молекулы доноров зарядов). В рамках этого подхода удалось выделить элементы, близкие по свойствам к обычным элементам функциональной электроники — аналоги элементов И, ИЛИ, НЕ, задержки. Модификация входов и выходов путем метилирования, ацетилирования или фосфорилирования, представляющая собой проявление полифункциональности биомолекул, существенно расширяет возможности их применения при построении ССИВС надмолекулярных структур.

Анализ разнообразных вариантов ССИВС позволил установить, что в биоструктурах они формируют блоки. В перспективе в дальнейшем может быть осуществлена их систематизация и классификация, основанная на выполняемых ими функциях. Показано, что связь кофакторов, таких как гемы, и олигонуклеотиды (НАД, НАДФ) и другие осуществляется через ССИВС. При этом ССИВС не имеют строгой локализации в пределах одной субъединицы и могут переходить из одной структуры в другую. Это послужило отправной точкой выдвинуть положение, что не только отдельные биоструктуры могут содержать ССИВС, а что ССИВС должны переходить, не прерываясь, из одного типа структур в другой и принцип континуальности ССИВС должен быть последовательно реализован в клетках как целостных системах.

Дальнейшее развитие принципа континуальности ССИВС нашло конкретное физическое воплощение в разработке ряда моделей молекулярного характера, а именно:

модели топологического кодирования цепных полимеров (белки — частный случай таких полимеров), моделей биокатализа, биомембран и хемосенсорики, изложенных в данной книге и проанализированных в свете современных экспериментальных данных (главным образом структурных).

Принцип континуальности ССИВС, как это ни кажется парадоксальным, оказался основополагающим при разработке модели топологического кодирования цепных полимеров. Предполагается, что группы, связывающие звенья таких полимеров в линейную цепь содержат, способны формировать непрерывные ССИВС. Например, в белках такими звеньями являются HN–C=O-группы, но, как показано в работе, возможны и иные типы групп. Боковые цепи полимера могут при этом оказывать двоякое воздействие на формирование ССИВС — способствовать их развитию, в частности полярные группы, и препятствовать их образованию — ряд неполярных боковых цепей. Таким образом, возможность самоорганизации структур на основе непрерывных ССИВС заложена уже в самой структуре цепных полимеров.

Модель топологического кодирования, как она изложена в настоящей работе, состоит из трех взаимосвязанных составных частей: топологического кода, алгоритма кодирования и системы физических операторов, воссоздающих закодированную структуру. Основанием для построения топологического кода является элементарный 4-х-звенный фрагмент цепного полимера, полное описание всех конформаций, рассмотренное на математическом аналоге — 4-х-звенном графе, которого дает 64 матрицы из 6 булевых переменных. Не входя в детали, можно сказать, что полученная таким образом формальная модель топологического кодирования оказалась вполне пригодной для описания свойств реального генетического кода, таких как триплетность, вырожденность, неперекрываемость, а также вскрыть проблему соответствия боковых цепей аминокислот определенным типам триплетов. Так, триплетам, кодирующим открытые конформации 4-х-звенного фрагмента белка должны соответствовать (и реально соответствуют) неполярные аминокислоты (операторы антисвязности), а триплетам, кодирующим циклические конформации — полярные аминокислоты (операторы связности). Участие боковых цепей в качестве физических операторов требует, чтобы они имели единый тип стереоконфигурации, тем самым в рамках этой модели находит принципиальное объяснение природа хиральности биомолекул. Оптимальным условием работы боковых цепей аминокислот в качестве физических операторов является ко-трансляционный механизм самоорганизации структур.

Важной составной частью предложенной модели топологического кодирования является система физических операторов. Разработка принципов создания таких систем (канонических наборов) существенно продвинулась в последние два года. В книге изложен новый подход к этому вопросу с точки зрения группы векторов, действующих на формирование четырехзвенного фрагмента цепного полимера. Физические операторы в этом случае выступают в качестве неприводимых представлений группы векторов. Результатом этой работы явилось создание общей модели структуры канонического набора физических операторов, построенной на принципах антисимметрии на додекаэдре, двухъярусной ее модификации, а также модели молекулярной векторной машины. Эти представления были апробированы на каноническом наборе аминокислот и получили существенное подтверждение. Аналогичные принципы могут быть положены в основу систематизации и ряда других биомолекул, в частности азотистых оснований (включая минорные). В книге эти принципы были

приложены также к анализу функциональных групп аминокислот как молекулярных модулей ССИВС.

В работе проведен также анализ формирования ряда узлов из полярных аминокислот (операторов связности) и показана его перспективность для конструирования отдельных функциональных фрагментов белков.

В основу модели работы ферментов — молекулярных микропроцессоров, был положен принцип формирования петли обратной связи из ССИВС, обеспечивающий возврат (рекуперацию) энергии, выделяющейся в ходе формирования фермент-субстратного комплекса. Модель использует общий механизм переноса зарядов по ССИВС и предполагает олигомерную организацию ферментов и колебательный режим работы активных центров. Модель разработана в статическом и динамическом вариантах. На примере анализа структурных данных лактатдегидрогеназы и Н-аденозинтрифосфатаза показана возможность использования предложенной модели для анализа работы ферментов. Показана универсальность «флип-флоп» механизма биокатализа для всех классов ферментов. На основе использованной в нашей книге теории эволюционного катализа А. П. Руденко развита популяционно-матричная модель эволюции олигомерных ферментов, которая может рассматриваться как определенный вклад в теорию биогенеза, и служить теоретическим основанием моделирования процессов самоорганизации бионических наноструктур.

Зонно-блочная модель мембранных структур, которые рассматриваются в книге в качестве аналогов больших интегральных схем, реализует принцип континуальности ССИВС в полной мере. По аналогии с большими интегральными схемами, эта модель предполагает существование в мембранных структурах ССИВС ближнего и дальнего порядка. Формирование ССИВС дальнего порядка может осуществляться за счет специальных бифункциональных молекул-скрепок, полярные группы которых формируют ССИВС, а неполярные обеспечивают ван-дер ваальсовы контакты с другими структурами мембран. Реализация модели переноса зарядов в структурах, связанных в интегральное целое в структуре мембран требует их олигомерной организации, а ориентация осей симметрии перпендикулярно плоскости мембраны приводит, вследствие симметрии олигомеров, к периодической двумерной организации мембран. Колебательный режим функционирования периодических олигомерных структур должен проявляться в мембранах в виде синхронных колебательных изменений и позволяет рассматривать такие мембраны как активные двумерных среды.

Зонно-блочная модель мембранных структур конкретизирована на примере биомембран, в которых в качестве основы для формирования зон ССИВС дальнего порядка предполагаются молекулы фосфолипидов. Рализа ция принципа континуальности в мембранных структурах проанализирована на конкретном примере — структуре цитохром с-оксидазы. Показан переход ССИВС из одной субъединицы в другую, связь через ССИВС гемных группировок цитохром с-оксидазы. Отдельный раздел посвящен встраиванию молекул фосфолипидов в структуру ССИВС этого фермента.

В книге изложены не только данные литературы, но и результаты серии работ, проведенных совместно с СПБ ГУ, по физической реконструкции зонно-блочной модели биомембран. Наиболее интересными в этом отношении оказались структура и электрофизические свойства изобутилфосфоэтаноламина гидрохлорида, а также структура комплекса изобутилфосфохолина с холестерином. На основе анализа распространения HO–P=O-групп в структуре биомембран, а также в составе разнооб-

разных биомолекул и биомакромолекул сформулирована гипотеза об активирующей роли фосфатных групп в процессах переноса зарядов по ССИВС.

Последняя модель, которая изложена в данной монографии, это модель хемосенсорики. Модель предполагает, что ССИВС, включающая также молекулы донора и акцептора зарядов, должна иметь разрывы, которые замыкаются функциональными группами, принадлежащими распознаваемым лигандам. Как и модель катализа, полная модель хемосенсора предполагает его олигомерную структуру и колебательный режим функционирования. Проведенный анализ структурных данных многочисленных известных к настоящему времени белковых рецепторов в целом подтвердил исходные концептуальные установки предложенной модели хемосенсорики.

Отметим, что в конце большинства глав, где изложены модели, основанные на концепции ССИВС, сформулированы общие принципы по конструированию тех или иных структур. Тем самым изложенная в данной книге концепция ССИВС, подкрепленная анализом современной литературы, может служить вполне современным введением в конструирование бионических наноструктур.