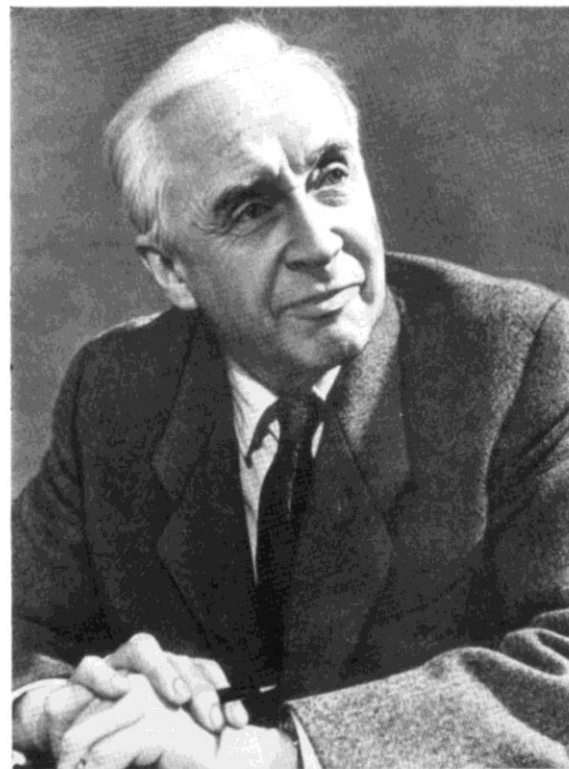


АКАДЕМИЯ
НАУК СССР

ИНСТИТУТ МОЛЕКУ- ЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ

• НАУКА • 1971



Директор Института и его организатор
академик В. А. Энгельгардт

АКАДЕМИЯ НАУК СССР

ИНСТИТУТ
МОЛЕКУЛЯРНОЙ
БИОЛОГИИ

ИЗДАТЕЛЬСТВО «НАУКА»
МОСКВА 1971

ЛАБОРАТОРИЯ ХИМИЧЕСКИХ ОСНОВ БИОСИНТЕЗА БЕЛКА

(Заведующий — академик В. А. Энгельгардт)

Лаборатория создана в 1967 г. на базе двух групп — биохимической и химической, которые до этого входили в состав лабораторий соответственно функциональной энзимологии и химических основ биологического катализа.

Основное направление ведущихся в лаборатории работ включает изучение химических механизмов, определяющих синтез белков с заданной аминокислотной последовательностью, и исследование возможностей направленного изменения первичной структуры белков в процессе их синтеза. Разработка этого круга вопросов осуществляется совместными усилиями группы биохимиков и группы химиков-органиков.

РАБОТЫ БИОХИМИЧЕСКОЙ ГРУППЫ

(Руководитель — канд. биол. наук Л. А. Киселев)

Первым этапом работы этой группы было исследование формы молекул тРНК в растворе с применением ряда физических методов. Результаты этого исследования, выполненного совместно с физическими лабораториями, привели к описанию молекулярной морфологии тРНК как асимметричной жесткой частицы, имеющей в гидратированном состоянии отношение осей $\sim 3:1$ (для эквивалентного эллипсоида вращения) и ориентацию плоскостей пар азотистых оснований, преимущественно перпендикулярную длинной оси частицы. Методами ферментативного гидролиза, химической модификации и

поляризованной флуоресценции показана компактность частиц тРНК в растворе, т. е. отсутствие отдельных полинуклеотидных цепей без вторичной структуры, связывающих биспиральные сегменты друг с другом.

В группе разработаны методы выделения индивидуальных тРНК, специфичных к валину и лизину, с применением ионообменной, обратно-фазовой и распределительной хроматографии. Полученные с помощью этих методов препараты индивидуальных тРНК были использованы как для структурных, так и для функциональных исследований (Т. И. Жилиева, В. Ш. Шейнкер).

Функциональное изучение тРНК было построено на селективной химической модификации пиримидиновых оснований тРНК, не участвующих в поддержании пространственной структуры. С этой целью были использованы гидроксилламин и О-метилгидроксилламин при разных рН. Была обнаружена резко различная чувствительность акцепторной функции различных тРНК к модификации цитозинового и урацильных оснований (Л. Ю. Фролова).

Дальнейший анализ был выполнен на валиновой тРНК1, модифицированной $^{14}\text{CH}_3\text{ONH}_2$; было установлено, что из 21 цитозинового остатка экспонированы (доступны для модификации) всего пять. Для сохранения акцепторной активности молекулы существенна только часть этих остатков. Установлено положение экспонированных цитозинов в первичной структуре (петля антикодона, акцепторный конец, дигидроуридиловая петля).

С помощью структурно-функционального анализа валиновой тРНК подтверждена гипотеза, сформулированная еще в 1964 г. (Л. А. Киселев), согласно которой основания антикодона нужны для проявления акцепторной активности.

В группе уделяется большое внимание развитию метода иммобилизованных систем применительно к исследованию тРНК. Были приготовлены колонки с полимером, содержащим ковалентно прикреплен-

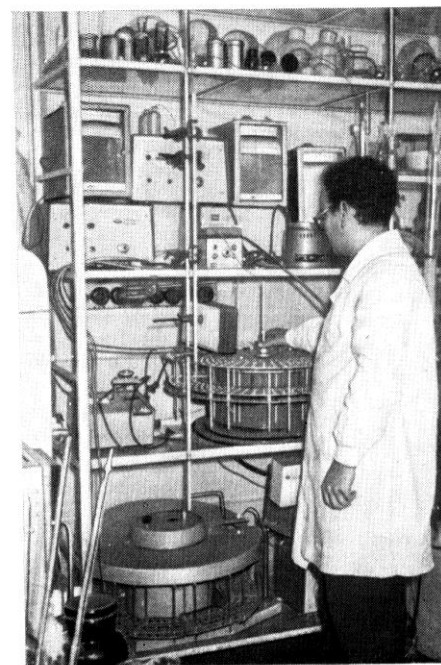
ную тРНК. На таких колонках оказалось возможным извлекать ферменты, реагирующие с тРНК (аминоацил-тРНК-синтетазы) за счет образования фермент-субстратного комплекса, что обеспечивает возможность эффективной очистки и получения индивидуальных ферментов. Аналогичный подход был использован для обнаружения комплексов мРНК-тРНК; в этом случае на колонке был иммобилизован полинуклеотид (Т. А. Авдонина).

При исследовании аминокацил-тРНК-синтетаз удалось разработать новый метод определения ферментативной активности на первой стадии реакции (активация аминокислот). Метод состоит в определении радиоактивных гидроксаматов, образующихся из активированных аминокислот, с помощью их сорбции на дисках катионообменной бумаги (А. В. Парин).

Цикл исследований был посвящен взаимодействиям синтетаз с субстратами (О. О. Фаворова, М. К. Куханова). Было показано, что в зависимости от исследуемого фермента и субстратов последние могут либо стабилизировать фермент, либо, наоборот, усиливать его чувствительность к неблагоприятным воздействиям. При термоинактивации валил-тРНК-синтетазы обнаружен защитный эффект тРНК, и он был использован для определения константы субстрата (K_s).

Обнаружено существование двух форм глицил- и лизил-тРНК-синтетаз (из печени крыс и *E. coli*, соответственно), отличающихся по хроматографическим свойствам, взаимодействию с субстратами, чувствительности к ингибиторам.

Для выяснения особенностей структуры и функции синтетаз осуществлено разделение двух функций фермента: превращение нормального бифункционального фермента в монофункциональный. Такая трансформация была выполнена на триптофанил-тРНК-синтетазе: после обработки меркаптоэтанолом фермент сохранял способность активировать аминокислоту, но не переносить ее на тРНК.



Установка для разделения нуклеиновых кислот и их фрагментов

Удаление «разобщителя» приводило к восстановлению энзиматической функции. Избирательное обратимое блокирование одной из функций синтетаз открывает новые возможности в изучении этой группы ферментов (А. В. Парин).

Были выделены также индивидуальные триптофанил- и лизил-тРНК-синтетазы, четвертичная структура которых исследуется. На триптофанил-тРНК-синтетазе из поджелудочной железы удалось получить набор активных форм фермента, различающихся по молекулярным весам от $\geq 200\,000$ до $\sim 30\,000$, что связано с субъединичным строением этого белка.

Интересно, что малая субъединица, сохраняя способность активировать аминокислоту, лишена способности катализировать перенос активированной аминокислоты на тРНК. Этот же фермент удалось получить в кристаллической («полимерной») форме в присутствии субстратной аминокислоты — триптофана. Полученные паракристаллы представляют собой «пачку», состоящую из параллельно уложенных «палочек» длиной ~ 1 мк и диаметром ~ 125 Å. Как показывают данные оптической дифракции, каждая палочка имеет структуру многозаходной спирали. Дальнейшее изучение полимерной формы фермент-субстратного комплекса позволит, как можно надеяться, составить представление о четвертичной структуре этого белка.

Планы биохимической группы на ближайшие годы концентрируются вокруг проблемы узнавания (рекогниции) — химической основы специфичности избирательного взаимодействия аминоацил-тРНК-синтетазы и тРНК. Выделение индивидуальных тРНК и ферментов, а также получение фермент-субстратных комплексов позволяет исследовать взаимодействующие компоненты как порознь, так и вместе, и на всех уровнях структуры — от первичной до четвертичной. Четвертичная структура ацилирующих ферментов выдвигает перед исследователями несколько вопросов, привлекающих в настоящее время внимание сотрудников группы: симметричны ли субъединицы по своим функциональным свойствам, каков размер минимальной структурной единицы фермента, еще способной осуществлять каталитическую функцию, обладают ли аминоацил-тРНК-синтетазы аллостерическими свойствами и т. д.

Как и раньше, будут широко использоваться иммобилизованные системы с целью получения препаративных количеств индивидуальных ферментов и их комплексов с тРНК, а также для различных целей.

РАБОТЫ ХИМИЧЕСКОЙ ГРУППЫ

(Руководитель — докт. хим. наук Б. П. Готтих)

В этой группе изучается механизм образования пептидной связи в рибосомах, а также исследуется возможность направленного синтеза белков, отдельные аминокислоты в которых заменены на другие. В качестве главной предпосылки для таких исследований необходимо было располагать общим методом получения аминокислотных и пептидных эфиров нуклеотидов и тРНК. Разработанный в группе новый метод синтеза аминокислотных и пептидных эфиров нуклеотидов открывает возможность реализации практически любых сочетаний аминокислотных и нуклеотидных компонент (А. А. Краевский, Н. Б. Тарусова). Схема синтеза включает три основных стадии: а) защиту аминогруппы аминокислоты; б) конденсацию N-защищенной аминокислоты с нуклеотидом; в) удаление N-защиты с аминогруппы. Для того чтобы эта схема была общей для всех основных типов нуклеотидов и нуклеозидтрифосфатов, необходимо было подобрать условия реакции так, чтобы с N-защищенной аминокислотой реагировали исключительно гидроксильные группы рибозидных остатков, но не аминогруппы ЦМФ, ГМФ и АМФ и не фосфатные остатки. Решить эту проблему удалось при проведении реакции в воде или в смесях воды (не менее 50 %) с апротонными слабосольватирующими растворителями. Из ряда исследованных известных способов активации наиболее удобным оказалась активация N-защищенных аминокислот в виде имидазолидов. Имидазолиды N-защищенных аминокислот и пептидов реагируют с нуклеотидами АМФ, ГМФ, ЦМФ и УМФ, а также с соответствующими нуклеозид-5'-трифосфатами в среде с преобладающим количеством воды в течение 1—4 час. при 20° и даже при 4°С, атакуя исключительно 3'- и 2'-гидроксилы. Из изученных N-защитных группировок наиболее приемлемой оказалась трет-бутилоксикарбонильная группа, которая легко удаляется обработкой абсо-

луктной трифторуксусной кислотой. Защита аминокислотной группы может быть эффективно осуществлена ее протонизацией, т. е. в результате образования соли. Использование имидазолидов N-протонированных аминокислот позволяет проводить синтез аминокислотных эфиров нуклеотидов в одну стадию. В процессе синтеза не происходит рацемизации аминокислоты.

Аминокислотные эфиры нуклеотидов напоминают по своей структуре акцепторный конец аминоацил-tРНК и могут выполнять поэтому функции псевдосубстратов аминоацил-tРНК на рибосомах. Применение для этих целей соединений, синтезированных сотрудниками группы, позволило показать, что аминокислотные эфиры нуклеотидов обладают большим сродством к трансферазному центру рибосом по сравнению с соответствующими нуклеозидными производными (Л. В. Николаева). Различия в специфичности зависят от строения аминокислотного остатка, его конфигурации, а также от количества отрицательных зарядов на фосфоэфирной группе.

Используя в качестве основы описанный выше метод синтеза аминоацилнуклеотидов, сотрудники группы разработали способ аминоацилирования tРНК (А. А. Краевский, Т. А. Цилевич), позволяющий присоединять неспецифические аминокислоты к молекулам tРНК.

При взаимодействии имидазолидов N-защищенных аминокислот (в том числе и имидазолидов N-протонированных аминокислот) с tРНК при 4° в водной среде за 1—3 часа синтезируются аминоацил-tРНК. Поскольку tРНК имеет рибозидные гидроксилы не только на акцепторном конце tРНК (при C'3 и C'2), но и на каждом промежуточном звене (при C'2), реакция проходит не только по акцепторному концу. Тем не менее именно гидроксилы акцепторного конца имеют повышенную реакционную способность, в связи с чем наблюдается определенная специфичность аминоацилирования tРНК по акцепторному концу. Эта специфичность сильно зависит от

условий реакции. При использовании имидазолидов N-протонированных аминокислот специфичность при выходах выше 50% может достигать 70—80%.

Метод аминоацилирования, развитый в лаборатории, открывает возможность неферментативного синтеза аминоацил-tРНК и тем самым вмешательства в процесс биосинтеза белка на уровне рибосом.

Основные публикации

Энгельгардт В. А., Киселев А. Л. О специфическом взаимодействии между кодирующим ферментом и tРНК. — In «Current aspects of biochemical energetics», p. 213—225, 1966.

Киселев А. Л., Авдонина Т. А. Специфические комплексы мРНК — tРНК в безрибосомной системе. — Молекулярная биология, 3, 113—120, 1969.

Парин А. В., Киселев А. Л. Избирательное обратимое торможение ацилирующей способности триптофанил-tРНК-синтетазы. — Молекулярная биология, 3, 632, 1969.

Парин А. В., Киселев А. Л. Множественность активных форм триптофанил-tРНК-синтетазы. — Молекулярная биология, 3, 901, 1969.

Фаворова О. О., Киселев А. Л. Глицил-tРНК-синтетаза из печени крыс: роль tРНК в образовании глицилгидроксаматов. — FEBS Letters, 6, 65, 1970.

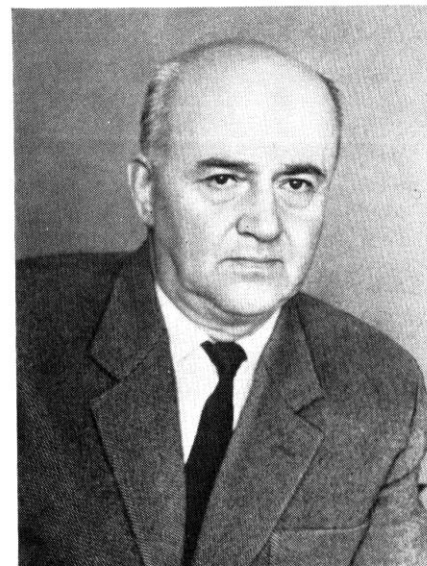
Готтих Б. П., Краевский А. А., Киселев А. Л., Фролова Л. Ю. Взаимодействие имидазолидов N-замещенных аминокислот с tРНК. — Молекулярная биология, 1, 767, 1967.

Краевский А. А., Пурегин П. П., Рудзит Л. Н., Белова З. С., Готтих Б. П. Аминоацильные производные нуклеозидов, нуклеотидов и полинуклеотидов. I. Синтез 3'(2')-O-аминоацил-5-нуклеотидов. — Изв. АН СССР, серия химич., 378, 1968.

Готтих Б. П., Николаева Л. В., Краевский А. А., Киселев А. Л. 3'(2')-O-аминоацилнуклеотиды как акцепторы полипептида в трансферазном центре рибосом. — FEBS Letters, 7, 112, 1970.

**ЛАБОРАТОРИЯ ХИМИЧЕСКИХ ОСНОВ
БИОЛОГИЧЕСКОГО КАТАЛИЗА**

(Заведующий — академик А. Е. Браунштейн)



Александр Евсеевич
Браунштейн

Лаборатория сформировалась в 1959—1960 гг. Основным направлением ее деятельности является исследование молекулярных основ каталитического действия ферментов и механизмов их избирательного ингибирования, иначе говоря — общих и специальных закономерностей энзиматического катализа. Задача решается путем исследования зависимости каталитической функции ферментной системы от структуры и взаимодействий ее компонентов —

природных и модифицированных форм ферментного белка, субстратов, кофакторов, ингибиторов.

Для этой цели используется широкий комплекс теоретических подходов и экспериментальных методов современной энзимологии (выделение высокоочищенных ферментов; кинетические исследования; ингибиторный анализ), биоорганической химии (модификация и маркировка функциональных групп; исследование строения пептидных фрагментов; синтез аналогов кофермента, псевдосубстратов и других ингибиторов; изучение модельных реакций), молекулярной физики (исследование спектров поглощения и люминесценции, дисперсии оптического вращения и циркулярного дихроизма; релаксационная спектроскопия — ЭПР, ЯМР, поляризация люминесценции; седиментационный, хроматографический и электрофоретический анализ; электронная микроскопия ферментов и др.).

В качестве модели для изучения химических и физических основ ферментативного катализа лаборатория по ряду соображений избрала обширную группу ферментов, содержащих пиридоксальфосфат (ПДФ). ПДФ-ферменты играют первостепенную биологическую роль в процессах азотистого обмена; некоторые особенности этих ферментов делают их весьма благоприятными объектами исследований по молекулярной энзимологии.

С участием общего для них кофермента, пиридоксальфосфата, эти ферменты осуществляют самые различные превращения одинаковых или близкородственных субстратов (аминокислот). Их каталитические свойства — субстратная специфичность, направление катализируемой реакции — определяются природой специфических белков (апоферментов), от структуры которых зависят различия в их взаимодействии с ПДФ и субстратами.

Главным объектом работ лаборатории являются высокоочищенные (химически индивидуальные или почти гомогенные) ПДФ-ферменты: аспартат-глутамат-аминотрансфераза (АС-трансаминаза) из сер-

дечной и скелетной мускулатуры; глутаматдекарбоксилаза (из *E. coli*); несколько ферментов, участвующих в десульфировании цистеина в тканях животных, и диаминоксидаза (ДО) из почек свиньи.

Исследуются макромолекулярная структура и конфигурационная устойчивость холо- и апоферментов, значение отдельных функциональных групп белка, кофермента и субстратов для последовательных стадий энзиматической реакции и для стабильности активной конфигурации ферментов; первичная структура пептидных фрагментов активного центра; физические (оптические и др.) и кинетические проявления взаимодействий ферментов с субстратом, коферментом, их аналогами и другими ингибиторами.

Из результатов исследований выводятся заключения о механизме действия исследуемых ферментов и ингибиторов и об общих закономерностях энзиматического катализа.

АСПАРТАТ-ГЛУТАМАТ-АМИНОТРАНСФЕРАЗА

(О. А. Поляновский, Ю. М. Торчинский, М. Я. Карпейский, В. А. Флорентьев)

С помощью физических методов (седиментационный анализ, поляризация люминесценции, малоугловое рассеяние рентгеновых лучей, исследование водород-дейтериевого обмена, спектрополяризметрические методы и т. д.) изучены молекулярные параметры нативного фермента и его модифицированных форм.

Показано, что АС-трансаминаза (молекулярный вес ~ 90 000) представляет собой димерный белок, способный к обратимой диссоциации на две идентичные субъединицы; каталитическая активность последних выше, чем у димерной формы. Изучено положение равновесия диссоциации и влияние на него ряда факторов, в том числе оказывающих возможное влияние на регуляцию активности ферментов в физиологических условиях. Исследованы изменения третичной

структуры и конфигурационной стабильности ферментного белка при связывания субстратов, кофермента и их аналогов, а также при модификации отдельных функциональных групп (сульфгидрильных, фенольных и др.).

Открыта индуцированная оптическая активность кофермента в активном центре АС-трансаминазы и других ПЛФ-ферментов; ее исследование (при помощи методов дисперсии оптического вращения и кругового дихроизма) дает ценную информацию о состоянии и реакциях коэнзима в различных формах и комплексах ферментов, часто не различимых по спектрам поглощения и флуоресценции.

Изучена роль отдельных групп апо- и кофермента, существенных для катализа (СО-группа ПЛФ, ϵ -NH₂-группа лизинового остатка белка и имидазольная группа гистидинового остатка), для связывания белка с ПЛФ и субстратами (все функциональные группы кофермента и один тирозиновый остаток белка) и для стабилизации активной структуры (одна из 4-х или 5-ти SH-групп на мономер и другой тирозиновый остаток).

Определена последовательность аминокислот в тетрапептиде и, частично, в 16-членном пептидном фрагменте активного центра, которые содержат остаток лизина, соединенный альдиминной связью с коферментом. Доказано (оптическими методами и путем выделения восстановленных Na-боргидридом кофермент-субстратных комплексов), что лизин вытесняется из этой альдиминной связи аминогруппой субстратов и псевдосубстратов с образованием «внешних», субстратных иминов кофермента.

Исследование механизма торможения АС-трансаминазы циклосерином и его аналогами послужило основой для разработки путей направленного синтеза избирательных ингибиторов ПЛФ-ферментов и, с другой стороны, способствовало раскрытию механизмов действия этих ферментов. Показано, что циклосерин действует в качестве стерически жесткого аналога молекулы аминокислоты (аланина),

который, связываясь в субстратном участке активного центра фермента, вступает в реакцию трансаминирования с коферментом и после раскрытия цикла необратимо блокирует (ацилирует) одну из существенных каталитических групп белка.

На основе тщательного сопоставления литературных данных и результатов изучения оптических и каталитических параметров ряда синтезированных в лаборатории производных витамина В₆ в модельных системах и в комплексах с апотрансаминазой М. Я. Карпейским и В. И. Ивановым предложена оригинальная пространственная модель молекулярного механизма ферментативного трансаминирования; некоторые главные черты ее приложимы и к механизму действия других ПЛФ-ферментов. Эта модель предусматривает динамические изменения пространственной ориентации кофермента относительно взаимодействующих с ним на последовательных стадиях энзиматической реакции групп белка и субстрата. Обратимые изменения ориентации пиридинового ядра кофермента сопряжены с кооперативными перемещениями нескольких протонов и перераспределением электронных плотностей в промежуточных комплексах. Модель выявляет (и иллюстрирует на конкретном примере) роль ряда факторов, в той или иной мере общих для многих, если не всех ферментов. Эти факторы принципиально отличаются энзиматические превращения от обычных химических реакций и позволяют понять главные причины высокой эффективности ферментативного катализа. Для этой модели характерна стабилизация в активном центре за счет многоточечного связывания с белком наиболее реакционно способных для данной стадии реакции электронных состояний реагирующих компонентов, а также расположение взаимодействующих групп по координате реакции данной стадии. Оба фактора реализуются для каждой стадии многостадийной ферментативной реакции благодаря структурным перестройкам в активном центре, на предыдущей стадии.

ГЛУТАМАТДЕКАРБОКСИЛАЗА

(Б. С. Сухарева, Ю. М. Торчинский)

Разработаны приемы выделения из *E. coli* гомогенных (кристаллических) препаратов декарбоксилазы и ее разложения на апо- и кофермент. Исследованы молекулярно-физические параметры и оптические свойства (спектры поглощения, круговой дихроизм) фермента, его комплексов с субстратом и ингибиторными псевдосубстратами. Показано, что при декарбоксилировании псевдосубстратов (α -метилглутамат, аспартат) фермент медленно инактивируется за счет abortивной реакции трансаминирования с образованием пиридоксаминфосфата и его отделением от апофермента. Такой же механизм лежит в основе постепенной инактивации, происходящей при действии декарбоксилазы на нормальный субстрат — глутамат.

Электронномикроскопические и седиментационные исследования, проведенные совместно с лабораторией электронной микроскопии, показали, что структура макромолекул фермента — гексагональные диски из морфологических субъединиц, образующих два концентрических кольца, — дезорганизуется в условиях, приводящих к частичному отщеплению кофермента (в том числе при «холодовом инактивировании» декарбоксилазы или в ходе взаимодействия с псевдосубстратами); каталитическая активность и исходная структура восстанавливаются при добавлении избытка ПЛФ или его аналогов.

ДИАМИНОКСИДАЗА

(Е. В. Горяченкова)

Разработан улучшенный метод получения диаминооксидазы из почек свиньи в практически чистой форме (1600-кратная очистка); изучены каталитиче-

ские и оптические свойства фермента. Подтверждены прежние выводы об идентичности диаминооксидазы и гистаминазы. Показано, что диаминооксидаза принадлежит к особому типу ферментов, которые содержат в качестве прочно связанных кофакторов двухвалентную медь и ПЛФ. Медь не меняет своей валентности в процессе окисления субстрата; в активном центре она находится в виде весьма стойкого клешневидного комплекса с белком и ПЛФ (его природа исследована методом ЭПР).

Свойства флуоресцирующих пептидных фрагментов, выделенных после расщепления диаминооксидазы протеиназами, говорят о том, что помимо хелатной связи с участием меди, ПЛФ, по-видимому, присоединен к пептидной цепи прочной ковалентной связью; природа этой связи исследуется.

ПЛФ-ФЕРМЕНТЫ, УЧАСТВУЮЩИЕ В РЕАКЦИЯХ СИНТЕЗА И ДЕСУЛЬФИРОВАНИЯ ЦИСТЕИНА

(Е. В. Горяченкова, Э. А. Толоса)

Впервые разработаны методы получения практически гомогенных препаратов цистеинлиазы желточного мешка куриных эмбрионов и серинсульфгидразы из печени кур; изучены их физико-химические и каталитические свойства (спектры поглощения, субстратная специфичность, отношение к ингибиторам).

Оба фермента специфически катализируют некоторые реакции β -замещения цистеина с освобождением H_2S , а серинсульфгидраза — также аналогичные реакции серина (с выделением H_2O), но, в отличие от цистатионазы и ряда родственных ПЛФ-ферментов (триптофаназа и др.), не образуют NH_3 и α -кетокислот путем реакций α , β -элиминирования. Цистеинлиаза и серинсульфгидраза конденсируют свои адекватные субстраты с различными меркапто-соединениями, образуя соответствующие тиоэфиры

цистеина. Главная биологическая функция серин-сульфидразы, по-видимому, состоит в биосинтезе цистатионина.

Сравнительное изучение субстратной и ингибиторной специфичности этих двух ферментов, с одной стороны, а с другой — цистатионазы и цистатионин-синтазы, позволяет сделать вывод о вероятной конформации кофермент-субстратных комплексов в активных центрах этих ферментов и о природе различий в механизме их действия.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Предстоит продолжить и углубить сравнительное изучение структуры и молекулярных основ каталитического действия упомянутых выше и некоторых родственных ПЛФ-ферментов. Цель этих исследований состоит в первую очередь в развитии важных общих вопросов теории ферментативного катализа. Наряду с этим специальную задачу составляет выяснение механизмов физиологической регуляции активности ПЛФ-ферментов и нахождение приемов управления их действием.

Эти задачи будут решаться путем разработки и применения новых методов: а) химической модификации молекул кофермента, субстратов и ферментных белков, б) исследования первичной структуры апоферментов и локализации в ней существенных функциональных групп, в) изучения с помощью физических методов (в том числе электронной микроскопии и рентгеноструктурного исследования) макромолекулярной структуры ПЛФ-ферментов, г) конформационного ингибиторного анализа строения и функций активных центров.

Важным этапом в исследовании аспартат-трансаминазы (а в дальнейшем и некоторых других ПЛФ-ферментов) явятся начатые в 1969 г., совместно с Институтом химии природных соединений АН СССР, работы по полному выяснению первичной струк-

туры пептидной цепи этого белка и расположения в ней отдельных функционально важных групп.

Электронномикроскопическим методом будет изучаться молекулярная морфология ряда исследуемых в лаборатории ПЛФ-ферментов. Предстоит провести предварительную работу по изучению крупных и изоморфно замещенных тяжелыми атомами кристаллов некоторых из них в целях их рентгеноструктурного исследования.

Основные публикации

Браунштейн А. Е. Связывание и реакции кофермента витамина B_6 в активном центре аспартат-трансаминазы. — *Vitamins and Hormones*, **22**, 451, 1964.

Химия и биология пиридоксалевого катализа (Труды II Международного симпозиума. Москва, сентябрь 1966) под редакцией Браунштейна А. Е., Северина Е. С., Снелла Е. Е. и Торчинского Ю. М., М., «Наука», 1968.

Браунштейн А. Е. Молекулярные основы каталитического действия и специфического торможения пиридоксальных ферментов. — В кн., «Механизмы регуляции действия ферментов и их биосинтеза» (Сборник под ред. В. Н. Ореховича). М., «Медицина», 1970.

Торчинский Ю. М., Коренева Л. Г. Аномальная дисперсия оптического вращения аспартат-глутамат-трансаминазы сердца. — *Биохимия*, **28**, 1087, 1963.

Есипова Н. Г., Дембо А. Г., Туманян В. Г., Поляновский О. Л. Морфологическая характеристика молекулы аспартат-трансаминазы. — *Молекулярная биология*, **2**, 527, 1963.

Иванов В. И., Карпейский М. Я. Динамическая трехмерная модель ферментативного трансаминирования. — *Advances in Enzymology*, **32**, 21, 1969.

Тихоненко А. С., Сухарева Б. С., Браунштейн А. Е. Электронномикроскопическое исследование глутамат-декарбоксилазы из *E. coli*. — *Biochim. Biophys. Acta*, **179**, 476, 1968.

Лак Игуен-Динь, Горяченкова Е. В., Браунштейн А. Е. Исследование субстратной специфичности серин-сульфидразы печени кур и отношение к некоторым ингибиторам. — *Биохимия*, **35**, 271, 1970.

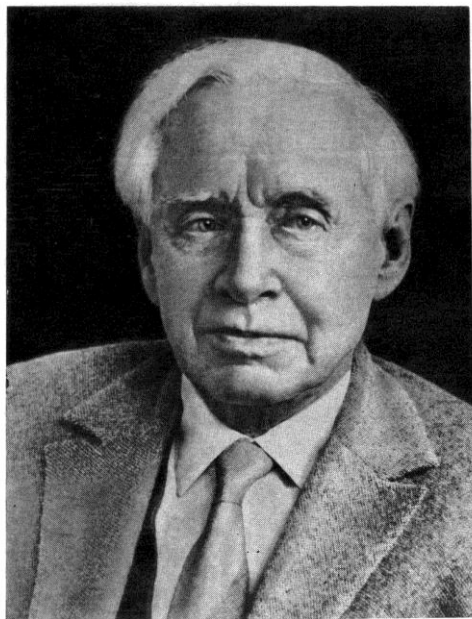
ИНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ

имени
В.А.Энгельгардта

1959–1989



„НАУКА“



В.А.Энгельгардт

АКАДЕМИЯ НАУК СССР
Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта

ИНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ

ИМЕНИ
В.А.Энгельгардта

1959 – 1989

Ответственный редактор
академик А.Д. МИРЗАБЕКОВ



МОСКВА «НАУКА» 1990

ЛАБОРАТОРИЯ ХИМИИ БЕЛКОВОГО СИНТЕЗА

Заведующий — доктор химических наук *Б. П. ГОТТИХ*

Лаборатория была организована в 1971 г. на основе группы сотрудников Лаборатории химических основ биологического катализа, которой руководил академик А. Е. Браунштейн. Основным научным направлением в первые годы ее существования являлось изучение субстратной специфичности и механизма функционирования пептидилтрансферазного центра рибосом. В качестве инструментов исследования наряду с некоторыми антибиотиками, например пуромицином, использовались 3'(2')-О-аминокислотные производные нуклеотидов, общий метод синтеза которых был разработан ранее (Б. Готтих, А. Краевский и др.). Позднее в лаборатории стали проводиться также исследования механизмов специфического взаимодействия двуцепочечных нуклеиновых кислот с белками и различными лигандами. В 1975 г. в лабораторию вошла группа химиков, которые занимались синтезом и изучением конформационных возможностей ациклических аналогов нуклеозидов и рибонуклеозидфосфатов как минимальных структурных моделей одноцепочечных рибонуклеиновых кислот.

Ведущим принципом организации научной работы лаборатории является комплексный характер исследований, осуществляемый в тесном контакте с сотрудниками различных подразделений Института и других научных учреждений как нашей страны, так и зарубежных. Свидетельством эффективности такого подхода и признанием значимости достигнутых результатов могут служить премии и дипломы Президиумов АН СССР и АН ЧССР (1979 г.), АН СССР и АН ГДР (1985 г.), которых был удостоен ряд сотрудников лаборатории.

В 1985—1986 гг. лаборатория претерпела существенную реорганизацию: большая группа сотрудников, руководимая А. Краевским, перешла во вновь созданную Лабораторию химического и биологического анализа биополимеров и клеток, а в лабораторию была переведена группа сотрудников во главе с Л. Абатуровым из Лаборатории изотопных методов.

В настоящее время научные исследования в лаборатории проводятся по трем основным направлениям.

Синтез и конформационный анализ нуклеозидов, олигонуклеотидов и их аналогов

(*В. Флорентьев, И. Ильичева, С. Кочеткова, И. Смирнов, А. Хорлин, Т. Цилевич, И. Шавелева*)

На основе изучения конформации нуклеозидов и нуклеотидов методом ЯМР (с помощью времен спин-решеточной релаксации) разработана общая концепция конформационного поведения этих соединений. Предложен простой и удобный метод расчета константы син-анти-равновесия нуклеозидов и нуклеотидов в растворе с использованием минимального числа легкодоступных экспериментальных параметров (химические сдвиги $H3'$ и $H2'$ и сумма констант спин-спиновой взаимодействия $J_{4'5'}$ и $J_{4'5''}$).

В качестве соединений, моделирующих различную относительную ориентацию нуклеинового основания и рибозного цикла, были изучены, в частности, ангидронуклеозиды. Разработанные в лаборатории удобные методы их синтеза дали возможность получить ряд ангидронуклеозидов, в которых нуклеиновое основание закреплено в *син*-, *анти*- и в высокой *анти*-конформации. Совместно с сотрудниками лаборатории рентгеноструктурного анализа был проведен рентгеноструктурный анализ синноподобных ангидронуклеозидов. Конформация ангидронуклеозидов в водном растворе была определена с помощью экспериментальных (ЯМР-спектроскопия) и теоретических (расчет атом-атомных потенциалов) методов. Сочетание этих же методов было использовано для изучения конформационной ситуации в ряду динуклеозидфосфатов.

Для стерически разрешенных конформеров ApA , ApC , CpA и CpC рассчитаны ожидаемые константы спин-спиновой взаимодействия протонов и скорости спин-решеточной релаксации. Путем сравнения рассчитанных и экспериментально измеренных величин этих параметров были определены компоненты закрытого состояния динуклеозидфосфатов в растворе. Показано, что в растворе димеров, кроме канонического *A*-подобного конформера, присутствуют неканонические конформеры, различающиеся типом стэкинг-контакта и знаком спирали (в том числе и левоспиральные), причем тип и относительный вес неканонических конформеров определяется нуклеотидной последовательностью. На основе полученных результатов выдвинута гипотеза конформационного кодирования, связывающая нуклеотидную последовательность олигонуклеотидов с его биологической функцией (совместно с Лабораторией физики биополимеров, Лабораторией инструментальных методов анализа и группой

компьютерного и структурного анализа биополимеров и автоматизации научных исследований).

К числу теоретических исследований относится и сравнительный анализ углеводных фрагментов трех природных нуклеозидов (включая арабинозиды) и их девяти азидо- и фторпроизводных, проявляющих различную степень терминальной активности в полимеразных системах. Результаты расчетов указывают на прямую зависимость степени избирательности терминатора по отношению к «ревертазе» от величины статистического веса е-форм углеводного цикла. Показано, что увеличение статистического веса е-форм характерно для 2',3'-дидезокси-3'-азидорибозы и для 3'-дезокси-3'-азидоарабинозы. Полученные данные примечательны в том отношении, что некоторые нуклеозидтрифосфаты, имеющие в своей структуре эти углеводные компоненты, являются эффективными ингибиторами обратной транскрипции.

Известно, что некоторые из ациклических аналогов нуклеозидов обладают антивирусной активностью и используются в медицинской практике.

В качестве примеров можно назвать ацикловир, BOLF-62, 3,4-диоксипропилгуанин, 2,3-диоксипропиладенин. Именно по этой причине, учитывая нужды практической медицины, в лаборатории ведется работа, направленная на скрининг веществ, обладающих противовирусной активностью. С этой целью синтезируются соединения нуклеозидного типа, содержащие вместо рибозы оксикальбиновые остатки, моделирующие различные фрагменты рибозного цикла. Наряду с гетероциклическими основаниями природных нуклеозидов в синтезе аналогов используются и триазолкарбоксамиды. Испытания на биологическую активность этих соединений планомерно проводятся в течение последних нескольких лет в Институте вирусологии им. Ивановского АМН СССР, Институте микробиологии им. Кирхенштейна АН ЛатвССР, НИИ микробиологии и эпидемиологии Минздрава БССР и в ряде других учреждений.

В результате предварительных испытаний выявлено несколько веществ, представляющих интерес для дальнейшей работы. Одно из них (ациклический аналог рибавирина), обладающее высокой активностью против вируса герпеса, защищено авторским свидетельством (совместно с Институтом вирусологии им. Ивановского АМН СССР).

Химия ДНК-специфичных лигандов и пептидов

(А. Жузе, З. Брусов, С. Гроховский, В. Николаев)

Основным направлением работы этой группы, проводимой совместно с сотрудниками лаборатории физики биополимеров, является исследование молекулярных механизмов, лежащих в основе специфического «узнавания» определенных последовательностей нуклеотидов в составе ДНК лигандами различной структуры.

Фундаментальным результатом, полученным при изучении комплексов антибиотиков дистамицинового типа с ДНК, явилось установление того факта, что NH-группы амидных связей антибиотиков служат реакционными центрами, специфичными к АТ-парам оснований ДНК (подробнее см. раздел «Лаборатория физики биополимеров»). Исходя из этого положения и развивая структурные концепции гипотезы белково-нуклеинового взаимодействия, предложенной в 1975 г. Г. Гурским и др., проводится синтез веществ, в которых CO—NH группы служат в качестве специфических реакционных центров для взаимодействия с основаниями ДНК. К ним относятся линейные пептиды разного состава и размеров; пептиды, сочлененные S-S-мостиком; производные нетропсина и дистамицина А, в том числе и такие, которые содержат пептидные «хвосты», и так называемые бис-нетропсины (бис-НТ). Последние представляют собой вещества, в которых два нетропсиноподобных фрагмента соединены между собой в разной ориентации алифатическими и олигопептидными цепочками разной длины. Совместно с Р. Бибилашвили и В. Речинским (работавшими ранее в Лаборатории стереохимии ферментативных реакций) было показано, что бис-НТ по сравнению с нетропсином обладают повышенной избирательностью связывания с ДНК и в разной степени блокируют инициацию синтеза ДНК на различных бактериальных промоторах.

Методом футпринта показано, что НТ и бис-НТ обладают разной специфичностью и могут быть использованы для селективного ингибирования рестриктаз на различных участках узнавания (совместно с ВКНЦ АМН СССР). С целью создания секвенспецифичных лигандов синтезированы производные нетропсина, содержащие тривалиновые фрагменты. Установлено, что в β -ассоциированной форме пептидные фрагменты связываются преимущественно с GC-богатыми участками ДНК, в то время как каждый нетропсиновый фрагмент в составе димера образует специфические связи с тремя АТ-парами. Показано, что бис-НТ, в молекуле которого два нетропсиноподобных

фрагмента, ковалентно присоединены к двум трипептидам Glu—Cys—Gly—NH₂, связанным друг с другом S-S мостиком, содержат как АТ-, так и GC-специфичные центры и взаимодействуют предпочтительно с последовательностью 5'-AAAGGTTT-3'.

Синтезированы пептиды с заданной аминокислотной последовательностью, способные участвовать в образовании антипараллельной структуры и избирательно связываться с определенными последовательностями пар оснований ДНК, а также пептиды, содержащие мотив спираль—поворот—спираль сгорепрессора фага 434.

На основе синтетического аналога GC-специфичного противоопухолевого антибиотика актиномицина D (AMD) и 7-аминоактиномицина D получен бис-актиномицин D (бис-AMD) — соединение, состоящее из двух остатков AMD, связанных депептидными цепочками разной длины. Показано, что в отличие от AMD, имеющего один GC-специфичный центр, бис-AMD содержит два таких центра и взаимодействует с 2 остатками гуанина, находящимися в разных нитях ДНК на определенном расстоянии друг от друга. 7-Аминоактиномицин D был также использован для флуоресцентно-микроскопического анализа ДНК в клетках и полигенных хромосомах, а также для количественного анализа ДНК при лазерной проточной цитометрии (совместно с Лабораториями функциональной морфологии хромосом и инструментальных методов анализа).

Кроме указанных исследований, осуществляется целевой синтез пептидов по программе борьбы с вирусом СПИД, а также как возможных антигенных детерминант ряда онкобелков (совместно с Лабораторией молекулярных основ онкогенеза).

Физико-химические исследования структуры белков

(Л. Абатуров, Ю. Лебедев, Н. Носова)

Целью работ, проводимых сотрудниками этой группы, является развитие представлений о динамической структуре глобулярных белков и функциональной роли конформационной динамики. Среди различных равновесных динамических процессов, реализующихся в нативной белковой структуре, основное внимание уделяется среднемасштабным конформационным переходам, фиксируемым методами водородного обмена и протеолитической деградации.

В настоящее время основные усилия группы направлены на выяснение роли водного окружения в формировании структуры

глобулярных белков, что позволяет приблизиться к пониманию структурно-динамических аспектов функционирования белков в клетке, начиная с процесса самосборки при биосинтезе и кончая физиологически регулируемой внутриклеточной деградацией. Было изучено влияние дегидратации, температуры, различных ионов и органических растворителей на конформационное состояние ряда глобулярных белков и модельных соединений, например гемоглобинов, лизоцима, РНКазы А, химотрипсина, различных полипептидов. Сумма результатов, полученных с помощью методов водородного обмена, протеолитической деградации, обмена субъединиц и различных оптических методов, позволила сформулировать следующую концепцию.

Фиксированные на полярных группах белков молекулы воды (гидратная вода) являются интегральной частью белковой структуры, выполняя роль ее антипластификатора, повышающего жесткость уникальной нативной конформации. В то же время мобильные молекулы растворителя — неотъемлемый компонент динамической структуры. С их активным участием реализуются среднемасштабные флуктуации двух типов. Конформационные флуктуации одного типа состоят во внедрении гидратной воды в «динамические» дефекты с иммобилизацией на полярных группах и вследствие этого могут характеризоваться понижением энтропии. Одновременная обширная иммобилизация молекул воды вызывает «инвертированные», функциональные переходы в эластине и холодовую денатурацию некоторых глобулярных белков (т. е. разупорядочивание структуры при понижении температуры). При флуктуациях другого типа молекулы воды проникают внутрь глобулы без иммобилизации. Сильный рост энтальпии и энтропии при таких флуктуациях отражает соответственно энергетическое ослабление взаимодействия воды с ее окружением и процесс смещения макромолекула — растворитель наряду с возможностью деиммобилизации гидратной воды. Конформационная флуктуация этого типа протекает как менее или более обширная (при тепловой денатурации) пластификация жесткой структуры — ее локальное или общее набухание. Такие флуктуации являются необходимым элементом обширных конформационных перестроек на уровне третичной и четвертичной структуры в процессе функционирования белков. Они также играют ключевую роль в протеолитической деструкции нативных белков, которая, как было ранее показано, является самоускоряющимся поэтапным процессом.

В процессе исследований широко использовались мутантные гемоглобины человека с идентифицируемыми точечными замещениями аминокислотных остатков. Они оказались полезны и для выяснения механизмов внутриклеточной деградации гемогло-

бина, сопровождающейся гемолизом эритроцитов. Ключевую роль в этом процессе выполняют гемихромы гемоглобина, которые имеют конформацию набухшей «расплавленной» глобулы и благодаря этому легко агрегируют и расщепляются протеазами (эта часть работы выполнялась совместно с Всесоюзным гематологическим научным центром Минздрава СССР).

ОСНОВНЫЕ ПУБЛИКАЦИИ

Поповкина С. В., Завгородний С. Г., Ажаев А. В., Котусов В. В., Вигестане Р. Я., Викторова Л. С., Куханова М. К., Гнучев Н. В., Краевский А. А., Готтих Б. П. Пептидилтрансферазный центр рибосом. Различия в субстратной специфичности акцепторного и донорного участков // Молекуляр. биология. 1978. Т. 12, № 2. С. 397—403.

Лысов Ю. П., Завгородний С. Г., Журкин В. Б., Флорентьев В. Л. Конформационные свойства ангидронуклеозидов // Биоорг. химия. 1982. Т. 8, № 11. С. 1535—1553.

Gursky G. V., Zasedatelev A. S., Zhuze A. L., Khorlin A. A., Grokhovskiy S. L., Streltsov S. A., Surovaya A. N., Nikitin S. M., Krylov A. S., Relchinsky V. O., Mikhailov M. V., Beabekashvili R. Sh., Gottikh B. P. Synthetic sequence-specific ligands // Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 1983. Vol. 47. P. 367—378.

Абатуров Л. В., Лебедев Ю. О., Носова Н. Г. Динамическая структура глобулярных белков: конформационная жесткость и флуктуационная подвижность // Молекуляр. биология. 1983. Т. 17, № 3. С. 543—567.

Покровская М. Ю., Лысов Ю. П., Флорентьев В. Л. Конформация динуклеозидфосфатов: гипотеза конформационного кодирования // Там же. 1985. Т. 19, № 1. С. 98—108.

Завгородний С. Г., Флорентьев В. Л. Новый метод количественного определения положения син-анти-равновесия в растворе пуриновых нуклеозидов и нуклеотидов // Биоорг. химия. 1987. Т. 10, № 11. С. 1496—1507.

Кочеткова С. В., Цилевич Т. Л., Смирнов И. П., Щавелева И. Л., Хорлин А. А., Готтих Б. П., Флорентьев В. Л. Соединения, подобные ацикловиру. I. Синтез «полных» ациклических аналогов нуклеозидов // Там же. 1988. Т. 14, № 6. С. 820—823.

Лейнсоо Т. А., Николаев В. А., Гроховский С. Л., Стрельцов С. А., Заседателев А. С., Жузе А. Л., Гурский Г. В. Присоединение тривалина изменяет специфичность связывания аналога нетропсина с ДНК // Молекуляр. биология. 1988. Т. 22, № 1. С. 159—175.

Гроховский С. Л., Суровая А. Н., Сидорова Н. Ю., Вотава Х., Шпонар Я., Фрич И., Гурский Г. В. Конструирование и синтез пептидов, способных специфически связываться с ДНК // Там же. 1988. Т. 22, № 5. С. 1315—1334.

Абатуров Л. В., Лебедев Ю. О., Молчанова Т. П., Носова Н. Г., Файзуллин Д. А. Конформационная жесткость и флуктуационная подвижность глобулярных белков: вода как стабилизатор и пластификатор структуры // Равновесная динамика структуры биополимеров / Под ред. Э. А. Бурштейна, Л. В. Абадурава. Пушкино, 1989. Р. 49—77.

ЛАБОРАТОРИЯ СТЕРЕОХИМИИ ФЕРМЕНТАТИВНЫХ РЕАКЦИЙ

Заведующий — доктор химических наук М. Я. КАРПЕЙСКИЙ

Лаборатория организована в 1971 г. на основе группы сотру- рудников Лаборатории химических основ биокатализа. Ее зада- чей является изучение стереохимии активных центров и меха- низма функционирования ферментов метаболизма нуклеиновых кислот.

Объектами исследования служат ферменты, катализирующие расщепление и синтез фосфодиэфирных связей в РНК. Разра- ботаны препаративные методы выделения гомогенных препара- тов ферментов, (терминальной нуклеотидилтрансферазы, нук- леазы S_1 , биназы и др.), пригодные для использования в полу- производственных условиях.

Синтез и свойства аналогов нуклеозидов, нуклеотидов и олигонуклеотидов рибо-ряда

(С. Михайлов, Н. Падюкова, Л. Колобушкина, М. Фомичева)

В связи с необходимостью исследования структуры и свойств комплексов ферментов с субстратами и продуктами значительное место в работах лаборатории занимают разработка методов синтеза, а также изучение физико-химических свойств и структуры аналогов нуклеозидов, нуклеотидов и их фосфорных эфиров. Разработаны общие методы синтеза и получены следующие серии: негликозидные аналоги компонентов нуклеиновых кислот, замещенные по атомам углерода рибозного кольца нуклеотидов и нуклеозидов, производные фторурацила, олигоизоаденилаты и их аналоги и др. При помощи различных физико-химических методов определена структура синтезированных соединений, а также параметры, характеризующие конформационные равновесия в растворе.

Изучение специфичности циклизующих рибонуклеаз и родственных ферментов

(Г. Яковлев, Г. Моисеев, А. Бочаров, Н. Чепурнова, О. Мамаева*, Е. Колбановская)

Проведено детальное изучение структурных основ специфичности циклизующих рибонуклеаз и нуклеазы S_1 с использованием синтезированных аналогов моонуклеотидов и динуклеозидфосфатов методами ЯМР, УФ, КД-спектроскопии, микрокалориметрии, кинетического анализа, полуэмпирических конформационных расчетов и рентгеноструктурного анализа кристаллических комплексов РНКазы S и гуанилспецифических рибонуклеаз с лигандами (совместно с Институтом кристаллографии АН СССР).

Выявлены инвариантные черты строения активных центров циклизующих рибонуклеаз и разработана структурная модель субстратной специфичности этого класса ферментов.

Согласно модели активный центр рибонуклеаз состоит из трех функционально и пространственно разделенных участков: узнающего — топохимически комплементарного «узнаваемому» нуклеозидному звену субстрата; каталитического — содержащего функциональные группы белка, принимающих непосредственное участие в образовании и превращении переходного состояния; и участка неспецифического связывания уходящей

группы. Узнавание нуклеозидного звена субстрата осуществляется по принципу максимального насыщения водородных связей между гетероциклическим основанием нуклеозидов и белком, причем решающее значение имеет образование водородных связей с основной цепью полипептида. Наиболее консервативным элементом активного центра является каталитический участок, в состав которого входят остатки гистидина и дикарбоновых аминокислот, природа, расположение и свойства которых находятся в соответствии с координатой реакции. Участок связывания уходящей группы определяет вторичную специфичность рибонуклеаз, фиксируя нуклеозидный фрагмент уходящей группы таким образом, чтобы обеспечить максимально благоприятную (с точки зрения стереоэлектронных эффектов) конформацию расщепляемой фосфодиэфирной связи. Топохимически однозначная фиксация переходного состояния достигается за счет многоточечных взаимодействий в фермент—субстратном михаэлисовом комплексе, образование которого является, как минимум, двухстадийным процессом.

Детальный кинетический анализ расщепления полирибонуклеотидов циклизующими рибонуклеазами позволил сформулировать и экспериментально обосновать концепцию о роли конформации фосфодиэфирного фрагмента одноцепочечных и двухцепочечных полирибонуклеотидов (основанную на учете стереоэлектронных эффектов) в различной устойчивости этих субстратов к нуклеазам.

Другие направления

Изучение субстратных и ингибиторных свойств моно-, ди- и трифосфатов метилзамещенных нуклеозидов в реакциях, катализируемых рибонуклеазами и РНК-полимеразами, позволило создать новый тип терминаторов ферментативного синтеза РНК, (совместно с НПО «Биотехнология» и ВКНЦ АМН СССР).

При исследовании биологических функций олигоизоаденилатов было установлено, что они являются специфическими, неконкурентными ингибиторами реакции ADP-рибозилирования белков, а их концентрация в клетке зависит в значительной степени от активности соответствующих фосфодиэстераз, в том числе индуцируемых интерфероном (совместно с Институтом органической химии АН СССР).

Разработаны химические основы применения пиридоксальфосфата для модификации белков, катализирующих различные превращения эфиров фосфорной кислоты, и продемонстрирована возможность использования фосфопиридоксильного остатка в качестве репортерной группы, чувствительной к окружению.

ОСНОВНЫЕ ПУБЛИКАЦИИ

Карпейский М. Я., Дудкин С. М., Сахаровский В. Г., Шляпников С. В. Изучение структуры и конформации активного центра РНКазы, модифицированной пиридоксальфосфатом // Структура и функции активных центров ферментов / Под ред. Ю. М. Торчинского. М.: Наука, 1974. С. 183—203.

Michailov S. N., Smrt J. Synthesis of modified terminator and initiator codons containing hydroxy alkyl analogues of nucleosides // Coll. Czechosl. Chem. Commun. 1975. Vol. 40, № 8. P. 2353—2363.

Карпейский М. Я. Активные центры ферментов: стереохимия и динамика // Молекуляр. биология. 1976. Т. 10, № 6. С. 1197—1211.

Липкинд Г. М., Карпейский М. Я. Теоретический конформационный анализ уридин-2',3'-циклооксифосфорана и его невалентного комплекса с рибонуклеазой S // Там же. 1978. Т. 12, № 2. С. 282—289.

Pavlovsky A. G., Borisova S. N., Borisov V. V., Antonov I. V., Karpeisky M. Ya. The structure of the complex of ribonuclease S with fluoride analogues of UpA at 2,5 Å resolution // FEBS Lett. 1978. Vol. 92, № 2. P. 258—262.

Сенченко И. Н., Колбановская Е. Ю., Бочаров А. Л. Получение и некоторые характеристики функционально гомогенного препарата нуклеазы S₁ из α-амилоризина // Молекуляр. биология. 1979. Т. 13, № 6. С. 1377—1383.

Карпейский М. Я., Мамаева О. К., Михайлов С. Н., Падюкова Н. Ш., Яковлев Г. И. Применение нуклеаз для синтеза 2'-5'-олигоаденилатов и их аналогов // Биоорган. химия. 1983. Т. 9, № 4. С. 496—504.

Желковский А. М., Колбановская Е. Ю., Пивазян А. Д., Карпейский М. Я. Регуляция уровня 2',5'-олигоаденилатов в L-клетках мышей // Молекуляр. биология. 1985. Т. 19, № 2. С. 489—495.

Карпейский М. Я., Яковлев Г. И. Топохимические аспекты субстратной специфичности рибонуклеаз // Итоги науки и техники. Сер. Биол. химия. М.: ВИНТИ, 1986. Т. 22. С. 1—180.

Айвазашвили В. А., Михайлов С. Н., Падюкова Н. Ш., Карпейский М. Я., Бибилашвили Р. Ш. 1-(3-С-метил-рибофуранозил)-урацилил-5-трифосфат — терминатор синтеза РНК, катализируемого РНК-полимеразой // Биоорган. химия. 1986. Т. 12. С. 708—709.

Karpeisky M. Ya., Dixon H. B. F. The use of pyridoxal phosphate for modifications of proteins // Coenzymes and cofactors. N. Y.: Wiley, 1986. Vol. 1, pt B: Vitamin B₆. P. 71—117.

Моисеев Г. П., Яковлев Г. И., Бочаров А. Л. Исследование механизма гидролиза двухспиральных полирибонуклеотидов циклизующими рибонуклеазами // Биоорган. химия. 1987. Т. 13. С. 189—197.

Павловский А. Г., Строкопытов Б. В., Борисова С. Н., Карпейский М. Я., Вайнштейн Б. К., Яковлев Г. И. Структура комплекса рибонуклеазы Рb₁ с 3,5-гуанозиндифосфатом при разрешении 1,5 Å // Докл. АН СССР. 1987. Т. 292, № 5. С. 1253—1256.

Padjukova N. Sh., Karpeisky M. Ya., Kolobushkina L. I., Mikhailov S. N. 5'-Nucleotide phosphonate analogs // Tetrahedron Lett. 1987. Vol. 28, № 31. P. 3623—3626.

Beigelman L. N., Ermolynsky B. S., Gurskaya G. V., Tsapkina E. N., Karpeisky M. Ya., Mikhailov S. N. New synthesis of 2-C-metynucleosides starting from D-glucose and D-ribose // Carbohydr. Res. 1987. Vol. 166. P. 219—232.

Чепурнова Н. К., Ляхов Д. Л., Речинский В. О., Карпейский М. Я. Внеклеточная рибонуклеаза *Bacillus thuringiensis* // Биохимия. 1988. Т. 53. С. 605—612.

**ЛАБОРАТОРИЯ
ХИМИЧЕСКОГО И БИОЛОГИЧЕСКОГО АНАЛИЗА
БИОПОЛИМЕРОВ И КЛЕТОК**

Заведующий — доктор химических наук *А. А. КРАЕВСКИЙ*

Лаборатория организована в 1984 г. в результате выделения группы сотрудников из Лаборатории химии белкового синтеза,

а также некоторых сотрудников из других лабораторий института.

Главное научное направление группы биосинтеза ДНК — изучение особенностей матричного синтеза ДНК, катализируемого различными ДНК-полимеразами, и возможности его регуляции. Основным подходом является применение модифицированных субстратов и субстратных ингибиторов элонгации ДНК в системах *in vitro* и *in vivo*. Наряду с этим в лаборатории проводится изучение первичной структуры различных белков и осуществляются исследования экспрессии чужеродных генов в животных клетках. Кроме того, изучаются структурно-функциональные особенности аминотрансфераз.

Лаборатория обеспечивает сотрудников института возможностью работы с культурами клеток, для чего при лаборатории создан клеточный блок общепользовательского пользования.

Изучение особенностей матричного синтеза ДНК

(*А. Краевский, М. Куханова, Н. Тарусова, Л. Александрова,
Н. Дяткина, А. Арзуманов, А. Атражев, Л. Викторова,
Т. Розовская, В. Казаков*)

Разработаны пути химического синтеза новых аналогов нуклеозидов и нуклеозид-5'-трифосфатов, модифицированных по углеводному остатку, основанию или фосфатной группе, среди которых 2',3'-дидезоксинуклеозиды, имеющие в 3'-положении азидо-, хлор-, ацетил-, amino- и другие заместители, 3'-дезоксарабинонуклеозиды, содержащие в 3'-положении азидо- и аминогруппы, а также ряд других аналогов нуклеозидов и их 5'-трифосфатов (эта работа выполняется в соответствии с Государственной программой по борьбе со СПИД и отдельные ее части выполнены совместно с Центральным институтом молекулярной биологии Академии наук ГДР и Куйбышевским государственным университетом). Предложены технологические способы полного химического синтеза 3'-азидо-2',3'-дидезоксинуклеозидов и 2',3'-дидезоксинуклеотидов и получены авторские свидетельства (в соавторстве с Московским институтом тонкой химической технологии им. М. В. Ломоносова, НПО «Витамины» и Институтом биоорганической химии АН СССР).

Синтезирован ряд аналогов 2'-дезоксинуклеозид-5'-трифосфатов, содержащих в гетероциклическом основании флюоресцентные красители или присоединенный на различных линках биотин. Такие аналоги используются соответственно для полу-

чения флюоресцентно меченной ДНК или зондов для гибридизации на основе авидин-биотинового комплекса.

Набор аналогов, модифицированных по углеводному остатку, использован при изучении синтеза ДНК, катализируемого концевой дезоксиинуклеотидилтрансферазой и ДНК-полимеразой альфа из тимуса телят, бета из печени крыс, обратными транскриптазами вирусов миелобластома и саркомы Рауса птиц, ДНК-полимеразой I из *E. coli* и ДНК-полимеразой фага T4 (совместно с Институтом экспериментальной кардиологии ВКНЦ АМН СССР). Гомогенный препарат ДНК-полимеразы бета из печени крыс был выделен впервые.

Сравнительное изучение действия субстратных аналогов позволило выявить следующие закономерности: 1) разные ДНК-полимеразы проявляют различную специфичность к разным аналогам нуклеотидов; 2) ни одна ДНК-полимераза не катализирует образования фосфамидных связей; 3) среди изученных ДНК-полимераз наиболее избирательными были ДНК-полимераза альфа из тимуса телят и ДНК-полимераза типа альфа из тутового шелкопряда (последние исследования проведены совместно с Институтом биологии развития АН СССР); 4) наименее избирательными оказались обратные транскриптазы ретровирусов; 5) выявлены группы соединений, специфично подавляющих биосинтез ДНК, катализируемый только обратными транскриптазами ретровирусов, и не влияющих на другие ДНК-полимеразы млекопитающих.

Последний вывод сделал возможным поиск селективных ингибиторов размножения ретровирусов в культурах тканей животных и непосредственно у экспериментальных животных. Сравнение действия ряда соединений этого типа на культуры лимфоцитов человека, инфицированные вирусом иммунодефицита человека типа I (ВИЧ-I) (совместно с Институтом вирусологии АМН СССР), на куриные эмбрионы и цыплята, инфицированных вирусом саркомы Рауса (совместно с ВНИИ технических антибиотиков и ферментов Минмедбиопрома СССР) и вирусом миелобластома птиц (совместно с Институтом молекулярной биологии и генетики АН УССР), позволило выявить несколько высокоселективных соединений, лучшими среди которых оказались 3'-азидо-2',3'-дидезокситимидин и его 5'-производные. Кроме того, некоторые из перечисленных выше соединений эффективно подавляли синтез ДНК вируса гепатита В, выделенного из крови больных людей (совместно с Институтом органического синтеза АН ЛатвССР и Лабораторией молекулярных основ онкогенеза Института молекулярной биологии АН СССР). Наконец, эти же соединения весьма эффективно подавляли синтез ДНК, катализируемый эндогенной обратной

транскриптазой интерцистернальных ядерных частиц типа А печени мыши, что открывает возможность исследования роли эндогенных обратных транскриптаз животных и человека (совместно с Институтом цитологии и генетики СО АН СССР).

Изучение первичной структуры пептидов и белков

(С. Шляпников)

Проводятся исследования механизма действия и биологической роли ряда ферментов, осуществляющих контроль за функционированием генетического аппарата клетки на основе анализа их первичной структуры.

Основными объектами являются внеклеточные гуанилсцифические РНКазы микроорганизмов, включая бактерии, актино- и микромицеты. Огромное многообразие про- и эукариотических микроорганизмов, являющихся продуцентами внеклеточных РНКаз, и широкий спектр ныне существующих видов обеспечивают возможность сравнительного исследования эволюционно удаленных между собой РНКаз на структурном уровне.

При анализе аминокислотных последовательностей гуанилсцифических РНКаз, выделенных из различных таксономических групп грибов, выявлены общие черты и особенности строения этих ферментов, локализованы консервативные и переменные области их первичных и вторичных структур. Показано, что внеклеточные гуанилсцифические РНКазы грибов образуют обособленное семейство ферментов, независимое от панкреатических РНКаз, хотя и те и другие выполняют подобную функцию с тождественным механизмом катализа. Сравнение первичных структур внеклеточных РНКаз микроорганизмов свидетельствует о том, что РНКазы бактерий, актиномицетов и микроскопических грибов являются гомологичными ферментами, дивергировавшими от одного общего предшественника. Филогенетическая дистанция между семействами РНКаз про- и эукариотов проявляется в большом разнообразии и вариативности их структур при сохранении общих закономерностей строения активных центров ферментов.

Исследование экспрессии чужеродных генов в животных клетках

(В. Прасолов, С. Серов, М. Резников, Н. Кондратьева)

Основное направление работ связано с развитием методов введения чужеродных генов в клетки млекопитающих и иссле-

дованием их экспрессии. Работы ведутся в тесном контакте со многими лабораториями Института и рядом других научно-исследовательских институтов. Подобные эксперименты существенны как для решения фундаментальных проблем молекулярной биологии, так и для биотехнологического производства, сельского хозяйства и медицины.

Получили развитие новые эффективные методы переноса чужеродных генов в культивируемые клетки млекопитающих, свободные от многих недостатков традиционного метода кальций-фосфатной трансфекции. Для стабильного введения экспрессирующихся генов человека и животных в перевиваемые клетки млекопитающих с успехом используются ретровирусные векторы, сконструированные на основе вируса лейкоза мышей Молони (с П. Чумаковым). При помощи этих вирусов была установлена возможность подавления активности определенных онкогенов с помощью антисмысловой РНК. Получены клоны клеток грызунов, продуцирующих гормон роста, интерлейкин-2, фактор некроза опухолей-бета человека и другие белки.

Развиваются методы введения чужеродной ДНК в живые клетки различной природы. В ходе этих работ проводятся исследования механизмов транслокации ДНК через плазматическую мембрану. Получены линии клеток, продуцирующих различные биологические вещества. Показана применимость метода электропорации для изучения транзитной экспрессии экзогенной ДНК в клетках эукариот (совместно с Институтом электрохимии им. А. А. Фрумкина АН СССР).

Изучение структурно-функциональных особенностей аминотрансфераз

(В. Кочкина)

Исходным фактом для понимания механизма функционирования аспартат-аминотрансферазы явилось обнаружение идентичности трехмерных структур и активных центров фермента в растворе и кристалле. Этот факт впервые был установлен при сравнительном исследовании каталитических свойств фермента в двух физических его состояниях и при определении энзиматической активности микрокристаллов белка. Три независимыми методами впервые получены данные в пользу того, что субъединицы димерной молекулы фермента из цитозоля сердца кур в растворе и кристалле структурно и функционально неэквивалентны друг другу.

ОСНОВНЫЕ ПУБЛИКАЦИИ

- Kukhanova M. K., Krayevsky A. A., Terentyeva N. A., Rasscazov V. A. Inhibition of replicative DNA synthesis in nuclei of *Strongylocentrotus intermedius* sea urchin embryo by 2', 3'-dideoxy-3'-aminonucleoside 5'-triphosphates // *Biochim. et biophys. acta*. 1984. Vol. 783. P. 221—226.
- Krayevsky A., Kukhanova M., Alexandrova L., Belyakova N., Krutyakov V. 2', 3'-Dideoxy-3'-aminonucleoside 5'-triphosphates inhibit the repair of DNA in rat liver chromatin // *Ibid*. 1984. Vol. 837. P. 216—220.
- Терентьев Л. Л., Терентьева Н. А., Рассказов В. А., Александрова Л. А., Викторова Л. С., Краевский А. А. Ингибирование отдельных стадий процесса репликации ДНК эмбрионов морских ежей // *Биохимия*. 1985. Т. 50, № 6. С. 1024—1029.
- Chidgeavadze Z. G., Beablashvili R. Sh., Krayevsky A. A., Kukhanova M. K. Nucleoside 5'-triphosphates with modified sugars as substrates for DNA polymerases // *Biochim. et biophys. acta*. 1986. Vol. 868. P. 145—152.
- Дяткина Н. Б., Краевский А. А., Ажаев А. В. Аминоазиды и их производные. Общий метод синтеза 3'-азидо-2',3'-дидезоксинуклеозидов // *Биоорганическая химия*. 1986. Т. 12, № 8. С. 1048—1053.
- Кочкина В. М., Кузнецов Д. А. Каталитические свойства аспартат-аминотрансферазы // *Биохимия*. 1986. Т. 51, № 6. С. 921—925.
- Dyatkina N., Minassian Sh., Kukhanova M., Krayevsky A., Janta-Lipinski M. von, Chidgeavadze Z., Beablashvili R. Properties of 2',3'-dideoxy-2',3'-dehydrothymidine 5'-triphosphate in terminating DNA synthesis catalyzed by several different DNA polymerases // *FEBS Lett*. 1987. Vol. 219, № 1. P. 151—155.
- Краевский А. А., Куханова М. К., Атражев А. М., Чиджавадзе З. Г., Библашвили Р. Ш. Субстратные ингибиторы биосинтеза ДНК // *Молекулярная биология*. 1987. Т. 21, № 1. С. 33—38.
- Шляпников С. В., Ботт В., Куликов В. А., Дементьев А. А., Зелинка Я. Внеклеточная гуанилспецифичная рибонуклеаза *Sa* актиномицета *Streptomyces aureofaciens*. Первичная структура и гомология с рибонуклеазами бактерий и грибов // *Биоорганическая химия*. 1987. Т. 137, № 6. С. 760—772.
- Агаркова И. Т., Серов С. М., Прасолов В. С., Черномордик Л. В. Использование электрической обработки для генетической трансформации эукариотических клеток // *Биол. мембраны*. 1987. Т. 4, № 12. С. 1289—1295.
- Прасолов В. С., Чумаков П. М. Антисмысловая РНК р53 подавляет пролиферацию нормальных и трансформированных клеток // *Молекулярная биология*. 1988. Т. 22, № 5. С. 1371—1380.