



УДК 547.962 : 541.63

© 1993 Т. В. Гогитидзе, Е. М. Попов

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ МОЛЕКУЛЫ
АНГИОТЕНЗИНА II
III. ПРИРОДА ПОЛИФУНКЦИОНАЛЬНОСТИ

Всероссийский заочный институт пищевой промышленности, Москва

Рассмотрены данные по различным видам биологической активности октапептидного гормона ангиотензина II и ряда его аналогов. Сопоставлены конформационные возможности молекул ангиотензина II и его аналогов с количественными характеристиками их биологической активности. На основании этого сопоставления установлена связь между низкоэнергетическими конформациями молекулы ангиотензина II и выполняемыми им биологическими функциями. Сделан вывод об актуальности конформаций группы А (шейп *fef* центрального тетрапептидного фрагмента молекулы) для взаимодействия с рецепторами гладкомышечных тканей и конформаций группы В (шейп *fee* центрального тетрапептидного фрагмента молекулы) для взаимодействия с рецепторами коркового слоя надпочечников.

Настоящее сообщение завершает серию наших публикаций [1, 2], посвященных структурной и структурно-функциональной организации ангиотензина II (АТ II) Asp¹-Arg²-Val³-Tyr⁴-Val⁵-His⁶-Pro⁷-Phe⁸

Главная цель работы заключается в рассмотрении на конкретном примере возможностей предложенного ранее подхода к исследованию природных олигопептидов в направлении от структуры к функции [3, 4].

Первый шаг на этом пути состоял в решении прямой структурной задачи, т. е. в нахождении по известной аминокислотной последовательности ангиотензина II набора низкоэнергетических пространственных форм молекулы [1]. Для этого были использованы разработанные одним из нас теория структурной организации и метод априорного расчета оптимальных конформаций природных пептидов [5, 6].

Знание количественных характеристик структурной организации молекулы — безусловно, необходимое условие последующего изучения структурно-функциональной организации гормона. Однако этого еще далеко не достаточно. Переход к выявлению на этом же количественном уровне физиологических особенностей ангиотензина II, как и любого другого природного олигопептида, сталкивается с трудностями принципиального характера. Они возникают главным образом из-за незнания причин полифункциональности пептидных гормонов. Отсутствие же ясности в этом вопросе обусловлено крайне скудной информацией о гормональных рецепторах, являющихся, как правило, мембранными интегральными белками.

Таким образом, задачу о структурно-функциональной организации гормона, проявляющейся при его взаимодействии с рецептором, приходится решать, по существу не располагая никакими сведениями о структуре последнего.

В этой ситуации нельзя ожидать единства мнений о причинах полифункци-

ональности ангиотензина II и других пептидных гормонов. Существующие на этот счет представления можно свести к двум крайним точкам зрения. Согласно одной из них [17], способность того или иного гормона стимулировать совершенно различные процессы жизнедеятельности в разных частях организма объясняется гетерогенностью рецепторов — иными словами, наличием нескольких специфических для данного гормона рецепторных белков. Такой точке зрения не противоречит известная структурная организация молекул гормонов. Природные олигопептиды в нативном состоянии представляют собой не строго детерминированные трехмерные структуры, как в случае высокомолекулярных белков, а наборы сравнительно немногочисленных пространственных форм с легко изменяющимися под действием внешних сил положением конформационного равновесия [6].

Распространена также иная трактовка этого явления. Она исходит из того, что каждый гормон способен образовывать продуктивный комплекс только с одним рецептором и, следовательно, вызывать всегда одно и то же аллостерическое изменение его конформации. В предположении одинаковости рецепторов полифункциональность гормона связывается уже не со спецификой самих гормон-рецепторных взаимодействий, а с особенностями систем, воспринимающих посылаемый сигнал. В этом случае многообразие физиологических действий гормона определяется не уникальной структурной организацией его молекулы и особенностями взаимодействия с рецепторными белками, а специфической структурной организацией тех систем, которые по-разному откликаются на один и тот же сигнал, идущий от взаимодействующих с ними одинаковых гормон-рецепторных комплексов. Очевидно, не может быть исключен и промежуточный вариант, допускающий возможность одновременного существования механизмов, отвечающих обоим точкам зрения на полифункциональность гормонов.

В изучении структурно-функциональной организации молекулы ангиотензина II мы приняли первую точку зрения, т. е. исходили из предположения о существовании у гормона нескольких рецепторов. Обоснованием сделанного выбора послужили для нас согласующиеся с таким допущением результаты проведенных ранее исследований брадикининпотенцирующих пептидов [7] и нейрогипофизарных гормонов — окситоцина, вазопрессина, вазотоцина и мезотоцина [8, 9].

Предположение о гетерогенности гормональных рецепторов, в частности рецепторов ангиотензина II, подтверждается результатами исследований, проведенных в последние годы. Так, на это указывают и различный характер взаимодействия аналогов ангиотензина II с рецепторами разных тканей (например, наличие нескольких аналогов с селективным действием) [10—13], и неодинаковое воздействие катионов на связывание самого гормона с рецепторами тканей различных органов [13], и обнаружение значительно различающихся по молекулярной массе рецепторов гормона в тканях печени кролика [14], плаценты человека [15], коры надпочечников крысы и собаки [16].

Однако наиболее существенный довод в пользу сделанного нами предположения о причине полифункциональности ангиотензина II был получен недавно при использовании непептидных антагонистов гормона [17, 18]. Применение нового класса непептидных антагонистов к исследованию рецепторов ангиотензина II позволило выявить наличие различных типов специфических рецепторов ангиотензина II в организме млекопитающих. Так, в одной из работ этой серии [18] к идентификации рецепторов в ткани коры надпочечников крысы были привлечены два сложных органических соединения, обозначенных авторами DUP-89 и WL-19. Оказалось, что каждый из них может связываться с рецептором только вполне определенного вида, в то время как ангиотензин II проявляет высокое сродство к обоим рецепторам. В результате было показано, что даже в одной ткани у гормона имеются два рецептора, по-разному представленных в клетках этой ткани. Позднее рецептор, имеющий повышенное сродство к антагонисту WL-19, был обнаружен в матке крысы и человека и в мозгу крысы [19]. Использование других непептидных антагонистов позволило также выделить различные типы рецепторов ангиотензина II в тканях печени и сосудов мозга крысы [19, 20].

Итак, ряд опытных данных свидетельствует о существовании у ангиотензина II набора рецепторов, предъявляющих различные структурные требования к гормону. Одна из задач настоящей работы как раз и заключается в установлении количественной взаимосвязи между имеющимся экспериментальным материалом и структурной организацией молекулы ангиотензина II и, тем самым, в более строгом обосновании трактовки полуфункциональности пептидных гормонов гетерогенностью рецепторов.

Если наше предположение справедливо и вполне определенная конформация из найденного в работе [1] для ангиотензина набора низкоэнергетических и легко переходящих друг в друга пространственных форм действительно осуществляет взаимодействие только с одним рецептором и, следовательно, ответственна за реализацию только одной функции, то следующая задача на пути к установлению структурно-функциональной организации ангиотензина II заключается в определении для каждого физиологического действия гормона актуального лишь для него, т. е. комплементарного соответствующему рецептору, конформационного состояния. Таким образом, требуется соотнести известные из теоретического анализа предпочтительные по энергии конформации с известными из эксперимента функциями. Поскольку структуры рецепторов, а тем более их активных центров неизвестны, эту задачу нельзя решить без привлечения дополнительной информации. Она может быть получена при изучении синтетических аналогов гормона.

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

Практически всем работам этого направления присущи три принципиально слабых момента. Первый, и самый существенный, обусловлен случайностью выбора искусственных аналогов. Второй слабый момент, также не позволяющий исследованиям такого рода подняться выше эмпирического уровня, заключается в игнорировании возможностей теоретического анализа конформационных состояний как самого гормона, так и выбранных синтетических аналогов.

Наконец, третий характерный для исследований в этой области момент состоит в отсутствии не только общего теоретического базиса, но и единого системного подхода к экспериментальному изучению гормонов. Несмотря на множество работ в этой области, все еще не представляется возможным хотя бы для одного случая сопоставить активности гормона с активностями синтетических аналогов по всему функциональному спектру. Как правило, при изучении биологических действий природного пептида каждый раз используются разные источники, разные ткани и, что наиболее существенно, разные наборы аналогов.

Отмеченные негативные черты, характеризующие современное состояние молекулярной эндокринологии, неизбежны при использовании чисто эмпирического подхода с присущей ему направленностью исследований от функции к структуре. Соображения общего порядка и скромность полученных за долгие годы конкретных результатов убеждают в том, что традиционный путь развития данной области, оправданный на начальном этапе накопления экспериментального материала, уже исчерпал свой научный потенциал и в познавательном отношении бесперспективен. Становится очевидной необходимость привлечения теоретического подхода и проведения исследований гормонов в направлении от структуры к функции.

При полифункциональности пептидных гормонов, гетерогенности рецепторов и отсутствии информации о строении последних самая главная, узловая проблема, попытаться решить которую можно только с помощью соответствующих теоретических разработок, заключается в переходе от случайного, чисто интуитивного поиска синтетических аналогов методом «проб и ошибок» к их целенаправленному,

отвечающему специальным требованиям выбору. Чтобы быть полезным в изучении зависимости между структурой и функциями гормона, каждый его синтетический аналог должен быть по возможности монофункциональным, т. е. выполнять одну из функций природного пептида и, следовательно, обладать способностью принимать из набора его актуальных низкоэнергетических конформаций только одну пространственную форму, комплементарную активному центру соответствующего рецептора. Таким образом, необходимы лишь такие аналоги, которые обладали бы наперед заданными электронно-конформационными свойствами. В сравнении с априорным расчетом конформаций по известной аминокислотной последовательности возникающая здесь задача противоположна по своей постановке, поэтому она была названа обратной структурной задачей [3].

Обратная задача заключается в теоретическом определении природы химических модификаций, которые требуются для выделения конформации, актуальной для соответствующей функции гормона. Более общая цель состоит в целенаправленном конструировании химической структуры молекулы, заведомо принимающей такое пространственное строение, которое необходимо для реализации вполне определенной функции.

Метод решения обратной структурной задачи основан на количественной конформационной теории природных олигопептидов и белков и использовании естественной классификации пептидных пространственных структур. Подробно метод описан в работе [3]. Он позволяет до синтеза и биологических испытаний предсказывать необходимый для исследования структурно-функциональной организации гормона весьма немногочисленный ряд искусственных аналогов.

Решение обратной задачи делает реальным подход от структуры к функции. Работа в этом направлении может проводиться в следующем порядке.

Вначале для природного пептида рассматривается прямая структурная задача и определяется набор его конформаций, предпочтительных по энергии и, следовательно, потенциально биологически активных. На следующем этапе решается обратная структурная задача и формируется серия синтетических аналогов, пространственные структуры которых воспроизводят в своей совокупности все низкоэнергетические конформационные состояния молекулы природного пептида, а по отдельности — одно из этих состояний.

Следующий этап представляет собой экспериментальную часть работы, которая включает в себя установление полного спектра биологических действий гормона с оценкой активности каждой функции, синтез модельных соединений и их количественное тестирование по всему функциональному спектру природного пептида. Исследование завершается сопоставлением результатов расчета с опытными данными и идентификацией конформационных состояний гормона, актуальных для осуществления той или иной функции, — иными словами, установлением зависимости между структурой и функцией.

Обратимся к конкретному объекту данного исследования — ангиотензину II, для которого нами уже были решены прямая и обратная структурные задачи [1, 2]. При последующем изучении гормона пришлось, однако, несколько отступить от строгой логики рассмотренного только что порядка работы. Вынужденное отступление хотя и не принципиально, тем не менее ведет к неполному использованию возможностей подхода от структуры к функции. Оно связано с тем, что мы не располагали всем необходимым экспериментальным материалом, а опирались лишь на имеющийся в литературе.

На сегодняшний день ангиотензин II — наиболее изученный пептид, что и послужило причиной его выбора в качестве объекта нашего исследования. Известные опытные факты весьма многочисленны и касаются как самого гормона, так и многих сотен его синтетических аналогов. Большое число посвященных ангиотензину II публикаций, однако, существенно не сказалось на качественном уровне работ и полученных результатах. Как и аналогичным исследованиям других гормонов, им также свойственны все отмеченные выше слабые моменты

Основные функции ангиотензина II и места их реализации в организме млекопитающих

Функции	Органы и ткани	Литература
Стимуляция сокращения гладких мышц	Гладкие мышцы артериол	[21]
Регуляция секреции альдостерона	Корковый слой надпочечников	[22]
Регуляция артериального давления, секреции вазопрессина, усиление жажды и солевого аппетита	Головной мозг (ствол, гипоталамогипофизарная система, образование нейронального круга жажды и др.)	[23—25]
Регуляция почечной гемодинамики, секреции ренина, проницаемости стенок почечных канальцев	Почки (почечные артериолы, стенки почечных канальцев, клетки юкстагломерулярного аппарата)	[26—28]
Увеличение силы сердечных сокращений	Сердечная мышца	[29]
Стимуляция секреции катехоламинов	Мозговой слой надпочечников	[30]

чисто эмпирического подхода: случайность выбора аналогов, незнание структурной организации молекул и отсутствие системы в изучении функций.

В табл. 1 перечислены известные функции ангиотензина II с указанием мест их проявлений в организмах млекопитающих. Как уже отмечалось, к изучению этих функций привлечено огромное количество аналогов. Однако ни для одного из них мы не смогли найти опытных данных, характеризующих их действия по всему спектру биологических активностей гормона. Удалось обнаружить лишь несколько аналогов, для которых получены количественные данные по трем функциям ангиотензина: стимуляции сокращений гладких мышц и регуляций секреции альдостерона и катехоламинов. Соответствующие значения активностей этих аналогов и природных пептидов сопоставлены в табл. 2.

Среди количественных оценок эффективности взаимодействий гормона и его аналогов с рецепторами наиболее непосредственно характеризуют особенности структурной организации молекул величины внутренней активности (α_p) и сродства (pD_2) (см. примечания к табл. 2). Для аналогов, обладающих полной внутренней активностью, по величинам pD_2 можно судить об эффективной концентрации агониста, требуемой для осуществления биологической функции, и, следовательно, о вероятности реализации у данного аналога пространственной структуры, комплементарной активному центру рецептора и отвечающей соответствующему конформационному состоянию гормона. Действительно, чем дальше у агониста смещено положение конформационного равновесия от актуальной для данной функции пространственной структуры, тем выше должна быть его концентрация для достижения определенного эффекта и тем самым ниже величина его сродства к рецептору.

С другой стороны, вероятность реализации актуальных конформаций определяется величинами относительной внутренней энергии, которая была найдена нами для гормона и приведенных в табл. 2 аналогов при решении прямой и обратной задач (табл. 3). Путем сопоставления данных табл. 2 и 3 попытаемся получить представление о значимости того или иного конформационного состояния для реализации соответствующей функции, т. е. о структурно-функциональной организации молекулы ангиотензина II. Заметим, что табл. 3 могла бы быть дополнена сколь угодно большим числом примеров. Не составляло бы, например, особого труда рассчитать конформационные возможности всех тех сотен синтетических аналогов ангиотензина II, которые были синтезированы и подвергнуты биологическим испытаниям, увы, очень разрозненным и неполным. Поэтому при существующем уровне исследований расширение табл. 3 мало что могло бы дать для решения поставленных задач. Следующие из сопоставления результатов

Таблица 2

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

Соединение	Гладкие мышцы [21]										Мозговой слой надпочечников [23, 31]				Корковый слой надпочечников [22, 31]				Прессорная активность, % [21]
	Аорта кролика					Желудок крысы					ОА, %		ОА, %		ОМИС, %		pA ₂		
	αE	pD ₂	ОС, %	pA ₂	αE	pD ₂	ОС, %	pA ₂	ОА, %	pA ₂	ОА, %	ОМИС, %	pA ₂						
АТ II	1,0	8,85	100	—	1,0	7,75	100	—	100	—	100	100	—	100	—	100	—	100	
[Pro ²]АТ II					1,0	5,64	0,7											1,3	
[Pro ³]АТ II			40 **															40	
[Pro ⁶]АТ II					1,0	7,5	56	—						15	—	100	—	10	
АТ III	1,0	7,62	5,6	—	1,0	7,8	105	—					100	—	100	—	38		
[Asn ¹]АТ II	1,0	8,11	18	—	1,0								—	—	—	—	—	100	
[Ala ⁸]АТ II	0			7,7	0			7,22					21	—	—	—	—	—	
[Leu ⁸]АТ II	0			8,78	0			8,6					8,53	—	—	—	—	—	
[Ile ⁸]АТ II	0			9,21	0			8,36					9,31	—	—	—	—	—	
АТ I	1,0	7,53	5,1		1,0	7,1	22						95	2	5			50	

* αE — внутренняя активность (отношение максимального отклика, вызываемого агонистом, к максимальному отклику, вызываемому АТ II); pD₂ — отрицательный логарифм концентрации агониста, вызывающий эффект, равный половине максимального (средство); pA₂ — отрицательный логарифм концентрации антагониста, снижающий эффект агониста в 2 раза; ОС, % — относительное средство агониста относительно средства ангиотензина II; ОА — относительная активность (отношение активности агониста к активности ангиотензина II при дозах средней эффективности); ОМИС — относительная мощность ингибирования связывания (отношение концентрации аналога и ангиотензина II, вызывающее вытеснение 50% меченого АТ II при связывании со специфическим рецептором); пропуск в таблице означает отсутствие данных по этому виду активности, прочерк — отсутствие данного вида активности.

** По отношению к рецепторам матки крысы.

Относительная энергия (ккал/моль) оптимальных конформаций ангиотензинов и синтетических аналогов

Группа и номер конформации	Ш е й л	АТ II	[Pro ²]АТ II	[Pro ³]АТ II	[Pro ⁵]АТ II	АТ III	[Asn]АТ II	[Ala ⁵]АТ II	[Leu ⁸]АТ II	[Ile ⁶]АТ II	АТ I
A ₁	fe	0	—	0	0	7,4	4,4	0	0	1,3	0,8
A ₂	ff — ef	0,9	—	—	0	1,2	0	1,3	2,0	4,0	0
A ₃	ff — fef — ee	3,5	—	—	8,8	5,1	3,4	4,7	1,5	0	7,9
A ₄	fe — ee	4,0	—	4,5	1,8	7,3	8,5	3,4	0,3	0,2	3,0
B ₁	ff — ee	3,5	—	—	6,4	4,1	5,3	6,2	4,6	1,3	9,9
B ₂	ee — ee	3,7	4,6	—	6,5	1,8	2,5	6,5	5,7	5,1	9,6
B ₃	fe — ee	4,4	—	—	—	—	2,6	5,7	2,8	3,7	—
B ₄	ee — fef — ee	4,6	9,5	—	—	0	2,7	6,5	6,3	7,9	7,5
B ₅	fe — ee	6,0	—	—	—	—	3,2	5,8	4,9	6,0	8,3
B ₆	ef — ee	7,0	0	—	6,5	4,1	8,0	9,3	6,1	5,4	—
C ₁	ff — efe — ee	7,5	—	—	—	9,5	—	7,6	4,1	4,2	—
D ₁	fe — fff — ef	7,8	—	—	—	5,3	9,8	8,0	9,1	—	5,4
E ₁	fe — eee — ee	7,8	—	—	7,4	9,0	—	8,2	4,5	4,0	—
F ₁	ef — eff — ef	8,0	0,8	—	—	4,0	4,8	8,0	8,9	5,0	7,6

Примечание. Прочерк означает, что энергия конформации превышает 10 ккал/моль.

расчета с опытными данными заключения и их особенность определяются не содержанием табл. 3, а лишь сравнительно небольшим, полезным для решения поставленных задач экспериментальным материалом, представленным в табл. 2.

Решение прямой задачи [1] показало, что конформационные возможности ангиотензина II могут быть описаны немногочисленным набором низкоэнергетических форм, подразделяющихся на две представительные группы А и В и единичные формы C_1 — F_1 (табл. 3). Конформации каждой группы имеют одну и ту же пространственную структуру центрального тетрапептидного участка молекулы $Val^3-Tyr^4-Val^5-His^6$ и отличаются друг от друга ориентациями N- и C-концевых дипептидных фрагментов.

Результаты решения обратной задачи [2] свидетельствуют, что аминокислотные замены в последовательности ангиотензина II могут приводить к существенным изменениям конформационных возможностей молекулы. При заменах, не затрагивающих функциональных остатков, новые низкоэнергетические пространственные формы не возникают, а имеет место смещение конформационного равновесия в пределах набора предпочтительных форм природного пептида.

Модификации химического строения гормона, как видно из табл. 2, избирательно отражаются на эффективности действий, присущих ангиотензину II. Поскольку экспериментальные данные, которыми мы располагали, относятся к взаимодействиям гормона и его аналогов с рецепторами тканей гладких мышц и коры надпочечников, попытаемся вначале идентифицировать оптимальные конформационные состояния ангиотензина II, комплементарные именно этим рецепторам.

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

Замена в последовательности гормона второго остатка на пролин ведет к почти полной потере сродства аналога $[Pro^2]AT II$ к рецепторам гладкомышечной ткани (относительное сродство не превышает здесь 0,7%), а замена третьего остатка оставляет сродство аналога $[Pro^3]AT II$ к рецепторам той же ткани по сравнению с гормоном довольно значительным (40%). В то же время высококонцентрированные дозы второго соединения не оказывают какого-либо воздействия на секрецию альдостерона [10].

Резко различаются и конформационные состояния двух пролинсодержащих аналогов. У молекулы $[Pro^3]AT II$ из всех низкоэнергетических конформаций ангиотензина II наиболее реальны представители группы А (табл. 3). В случае же $[Pro^2]AT II$ их реализация практически исключена; равновесие сильно смещено в сторону конформаций B_6 и F_1 , наиболее высокоэнергетичных в наборе ангиотензина II.

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

Кроме того, предположение об актуальности конформаций А для реализации сократительной функции ангиотензина II в гладких мышцах артериол как будто бы не согласуется с имеющимися данными о другом пролиновом аналоге —

[Pro⁵]AT II. Хотя в литературе почти отсутствует количественная информация о его функциях, тем не менее известно, что прессорная активность этого аналога на порядок меньше, чем у природного пептида (табл. 2), что указывает на его низкое сродство к рецепторам гладкомышечной ткани. Однако конформации группы А, ответственные, по нашему предположению, за сократительную функцию, у [Pro⁵]AT II наиболее предпочтительны. Противоречие на первый взгляд весьма серьезно, так как в данном случае замена Val⁵ на Pro⁵ гомологична. И тем не менее расхождение может быть только кажущимся, поскольку потеря данным аналогом прессорной активности поддается иной трактовке.

Расчет молекулы [Pro⁵]AT II показал, что включение остатка Pro между Tug⁴ и His⁶ ведет к существенному ограничению конформационной свободы пептидной цепи и к сильной деформации оптимальной геометрии структурных вариантов группы А, не выводя, однако, значения двугранных углов φ , ψ за пределы шейпа *fef* центрального тетрапептидного участка. Так, если расстояние между атомами C^γ остатков тирозина и гистидина в конформациях этой группы у ангиотензина II составляет около 5,5 Å, то у аналога [Pro⁵]AT II — 7,4 Å. Кроме того, на активность может повлиять то обстоятельство, что остаток Pro⁵ существенно ограничивает подвижность боковых цепей смежных остатков, которые, несомненно, эффективно взаимодействуют с рецепторами.

Таким образом, наше предположение о необходимости участия конформаций группы А в реализации сократительной функции ангиотензина II достаточно спорно. Тем не менее пусть оно будет служить нам рабочей гипотезой.

Веский довод в пользу этого предположения следует из сопоставления конформационных возможностей и биологических активностей молекул ангиотензина II и ангиотензина III — природного гептапептида, отличающегося от рассматриваемого октапептидного гормона отсутствием N-концевого остатка Asp¹. Оба соединения обладают одинаковым спектром биологических действий, однако эффективности каждого вида их деятельности, за исключением функционирования в тканях коры надпочечников, существенно различаются. Многочисленные исследования показали, что в отличие от воздействия на все остальные ткани, эффективность которого у ангиотензина III снижена по сравнению с ангиотензином II, в ткани коры надпочечников гептапептидный гормон вызывает такое же альдостеронстимулирующее действие, как и октапептидный [31], а по некоторым данным, даже несколько превосходит последний [22].

Если верна наша гипотеза о причине полифункциональности гормонов, то молекула ангиотензина III должна обладать соответствующими конформационными возможностями, адекватно отражающими наблюдающиеся сходство и различие в ее биологическом действии по сравнению с молекулой ангиотензина II. Действительно, устранение N-концевого остатка резко смещает конформационное равновесие в сторону структур группы В. Наиболее предпочтительной становится конформация B₄ (B₅); далее в этой группе идут B₂ (B₃), B₁ и B₆, уступающие наиболее выгодной соответственно 1,8 и 4,1 ккал/моль (табл. 3). В группе А имеется лишь одна низкоэнергетическая конформация — A₂ ($\Delta U = 1,2$ ккал/моль). Таким образом, среди пространственных структур, родственных низкоэнергетическим конформациям ангиотензина II, у молекул ангиотензина III наиболее вероятны B₄(B₅), A₂, B₂(B₃), B₁ и B₆, т. е. имеет место резкое смещение конформационного равновесия в сторону представителей группы В.

В работе [18] было обнаружено, что из двух типов рецепторов (I и II), выделенных из ткани коры надпочечников при помощи уже упоминавшихся нами пептидных антагонистов DUP-89 и WL-19, одинаково хорошо связывающих молекулу ангиотензина II, только рецепторы типа II (согласно [18]) имеют высокое сродство к ангиотензину III. Сродство же гептапептидного гормона к рецепторам другого типа (I) снижено по сравнению с рецепторами типа II в 12 раз.

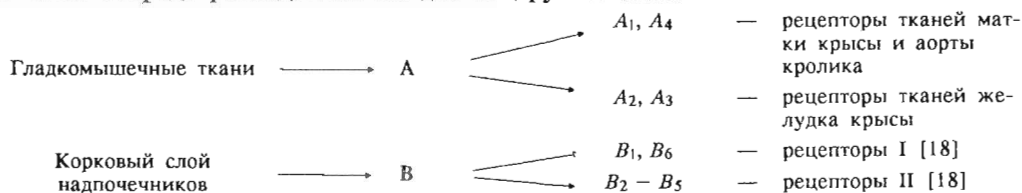
Эффективность взаимодействия ангиотензина III с рецепторами гладкомышечных тканей зависит от источника и органа. К рецепторам ткани желудка

крысы сродство гормона в 2 раза ниже, чем у ангиотензина II, а к рецепторам ткани аорты кролика оно снижено почти в 20 раз [21]. Наблюдающееся в этих случаях снижение сродства ангиотензина III можно объяснить более высокой энергией конформаций группы А, ответственных, согласно нашему предположению, за взаимодействие гормона с рецепторами гладкомышечных тканей. Последние, по-видимому, предъявляют различные требования к конформационному состоянию агониста. В этом случае состояния A_1 и A_4 можно отнести к актуальным для взаимодействия гормона с рецепторами ткани аорты кролика, а A_2 и A_3 — к актуальным для взаимодействия гормона с рецепторами ткани желудка крысы.

Высокое сродство ангиотензина III к рецепторам коркового слоя надпочечников согласуется с наибольшей вероятностью реализации конформаций группы В, что позволяет сделать вывод об их актуальности в осуществлении альдостеронстимулирующего действия гормона. Можно пойти дальше и предположить, что конформации $B_4(B_5)$ и $B_2(B_3)$ комплементарны активным центрам рецепторов типа II [18], а в B_1 и B_6 — типа I [18].

Другой аналог ангиотензина II — $[Asn^1]AT$ II почти в полной мере наделен всеми функциями рассматриваемого гормона $[Asp^1]AT$ II. Исключение составляют взаимодействия с рецепторами ткани аорты кролика. Конформационные возможности молекул $[Asn^1]$ - и $[Asp^1]AT$ II также весьма близки (табл. 3), если не считать различий в энергии конформаций A_1 и A_4 и, следовательно, в вероятности их реализации, которая у $[Asn^1]AT$ II существенно меньше. Значительно снижено и сродство этой молекулы к рецепторам аорты кролика (табл. 2). Таким образом, результаты конформационного анализа и данные биологических испытаний этого аналога согласуются со сделанным нами выводом о комплементарности конформаций A_1 и A_4 к рецепторам аорты кролика.

Итак, сравнительный анализ конформационных свойств и биологических активностей гормона и его аналогов показал, что между биологическими действиями и конформационными состояниями ангиотензина II существует зависимость, по которой структурные варианты группы А взаимодействуют с рецепторами, преобладающими в гладкомышечных тканях, а группы В — с рецепторами, преобладающими в тканях коры надпочечников, причем представители каждой группы в свою очередь распадаются на две подгруппы согласно схеме:



Классификация конформаций по подгруппам соответствует вполне определенным системам внутримолекулярных контактов валентно не связанных атомов. При решении прямой задачи ангиотензина II (см. табл. 4, 5 в [1]) было установлено, что наибольший вклад в стабилизацию конформаций A_1, A_4 и $B_2 - B_5$ вносит остаток Arg^2 . Боковая цепь Asp^1 ориентирована в среду и электростатически взаимодействует лишь с положительно заряженной гуанидиновой группой Arg^2 ; ее взаимодействия с остальной частью молекулы составляют менее 1 ккал/моль и имеют к тому же дестабилизирующий характер.

Иная система внутримолекулярных контактов в конформациях A_2, A_3 и B_1, B_6 : боковая цепь Arg^2 ориентирована в сторону от молекулы и лишь слабо взаимодействует с другими остатками, а Asp^1 , напротив, имеет многочисленные стабилизирующие контакты.

Различаются конформации подгрупп и по природе стабилизирующих взаи-

модействий. Если A_2, A_3 и B_1, B_6 предпочтительны по энергии невалентных взаимодействий атомов, то A_1, A_4 и $B_2 - B_5$ — по электростатическим взаимодействиям и водородным связям. Альтернативное отношение конформаций обеих подгрупп к полярности среды гри легкости их взаимных переходов делает весьма чувствительным положение конформационного равновесия ангиотензина II к внешним условиям, прежде всего к специфическим взаимодействиям с рецепторами.

Некоторые из приведенных в табл. 3 конформаций ангиотензина II различаются положением С-концевого остатка Phe^8 , значение которого для выполнения гормоном своих функций исключительно велико. Устранение этого остатка лишает ангиотензин практически всех его физиологических действий. Так, у $[\text{des-Phe}^8]\text{AT II}$ была обнаружена активность лишь по отношению к тканям мозга крысы [24]. Октапептидные аналоги, в которых Phe^8 заменен на другие аминокислотные остатки, как правило, хорошо связываются с рецепторами гормона, но не стимулируют соответствующие сигналы [21]. Результаты расчета аналогов $[\text{Ala}^8]$ -, $[\text{Leu}^8]$ - и $[\text{Ile}^8]\text{AT II}$, приведенные в табл. 3, показывают относительно небольшие изменения конформационных возможностей молекул по сравнению с природным пептидом. В то же время все они, как следует из табл. 2, не обладают полным спектром биологических действий ангиотензина II.

До сих пор мы рассматривали действия гормона и его аналогов на ткани гладких мышц и коры надпочечников. Сведений о взаимодействиях ангиотензина II с рецепторами других тканей очень мало. Известные факты, касающиеся, например, рецепторов мозгового слоя надпочечников [32], указывают на то, что они предъявляют менее жесткие структурные требования к природе и пространственному строению С-концевого участка последовательности. Так, $[\text{His}^9, \text{Leu}^{10}]\text{AT II}$, ангиотензин I, предшественник октапептидного гормона, имеющий низкое сродство к рецепторам гладких мышц и коркового слоя надпочечников, проявляет такую же, как ангиотензин II, активность в мозговом слое надпочечников. Синтетический аналог $[\text{Ala}^8]\text{AT II}$, выступающий, как уже отмечалось, в большинстве тканей антагонистом ангиотензина II, в мозговом слое тем не менее не блокирует действие гормона и даже проявляет некоторую агонистическую активность. Таким образом, удлинение пептидной цепи с С-конца и замена Phe^8 на Ala^8 не препятствует в данном случае ни связыванию с рецептором, ни его стимуляции.

В вводной части настоящего сообщения отмечалось, что главные цели исследования, представляющие интерес для молекулярной эндокринологии, заключались, во-первых, в апробации на конкретном примере предложенного в работах [3, 4] подхода к изучению структурно-функциональной организации гормонов в направлении от структуры к функции и, во-вторых, в проверке предположения о гетерогенности рецепторов как причине полифункциональности гормонов. Обе эти задачи решались на основе анализа имеющегося экспериментального материала о биологической активности ангиотензина II и его аналогов и известной структурной организации молекул.

Что касается второй задачи, то мы полагаем, она решена. Объяснение полифункциональности гормона на основе предположения о наличии в различных тканях организма ряда рецепторов, активные центры которых комплементарны соответствующим низкоэнергетическим конформациям природных пептидов, находит подтверждение в совокупности как экспериментальных данных, так и результатов нашего теоретического исследования.

Решение первой задачи, по нашему мнению, также не должно оставлять больших сомнений в принципиальной возможности с помощью выбранного подхода получать качественно новую и иным образом недоступную информацию о структурно-функциональной организации молекул гормонов. Однако нельзя сказать, что проделанная работа позволила выяснить всю потенцию, присущую комплексному теоретико-экспериментальному исследованию природных олигопептидов

в направлении от структуры к функции. Этому помешал ряд уже упоминавшихся и объективных для авторов причин, прежде всего отсутствие необходимых опытных данных о функционировании синтетических аналогов по всему спектру биологических действий ангиотензина II. И тем не менее можно надеяться, что полученные результаты достаточно убедительно свидетельствуют о перспективности использования подхода к изучению гормонов.

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

Взаимодействие гормона с рецепторами, расположенными в различных тканях, вызывает реакции, направленные на возвращение соответствующих показателей к норме, причем гормон воздействует на тканевом, системном и центральном уровнях. Так, вызванное ангиотензином II повышение тонуса гладкой мускулатуры артериол и усиление секреции катехоламинов мозговым слоем надпочечников приводят к повышению артериального давления. Задержка воды и ионов Na^+ в организме осуществляется гормоном главным образом путем стимуляции секреции альдостерона корковым слоем надпочечников, стимуляции секреции вазопрессина гипоталамо-гипофизарной системой, а также прямым действием гормона на почки. Отмеченные действия ангиотензина II дополняются его воздействием на центральные и периферические отделы нервной системы, опосредующим прессорные эффекты, а также усиливающим жажду и солевой аппетит, что в свою очередь приводит к увеличению объема циркулирующей крови и нормализации давления.

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

Способность осуществлять продуктивные взаимодействия сразу с рядом рецепторов и тем самым одновременно реализовывать соответствующее число скоординированных функций обеспечивается найденной нами структурно-функциональной организацией ангиотензина II. Ниже отмечены присущие пептидному гормону молекулярные свойства, обуславливающие возможность сочетания единой структуры с множественностью функций.

Во-первых, функциональный спектр гормона определяется наличием в физиологических условиях конформационного равновесия между несколькими пространственными структурами (конформационное равновесие — полифункциональность).

Во-вторых, отдельная функция гормона реализуется посредством актуальной только для нее конформации, входящей в состав энергетически предпочтительных структур свободной молекулы (одна конформация — одна функция).

В-третьих, активность гормона при реализации всех его функций обусловлена альтернирующим характером внутримолекулярных взаимодействий и относительной легкостью взаимных конформационных превращений при изменении окружения (специфические внешние условия — актуальная конформация).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гогитидзе Т. В., Попов Е. М. // Биоорганическая химия. 1993. Т. 19. № 5. С. 517—535.
2. Гогитидзе Т. В., Попов Е. М. // Биоорганическая химия. 1993. Т. 19. № 7. С. 693—703.
3. Попов Е. М. // Молекулярная биология. 1985. Т. 19. № 4. С. 1107—1138.
4. Попов Е. М. // Биоорганическая химия. 1992. Т. 18. № 9. С. 1229—1243.
5. Ророч Е. М. // Int. J. Quant. Chem. 1979. V. 16. № 4. P. 707—737.
6. Попов Е. М. Структурная организация белков. М.: Наука, 1989. 352 с.

7. Попов Е. М., Севастьянова Н. Р.//Биоорган. химия. 1981. Т. 7. № 8. С. 1478—1486.
8. Спасов В. З., Попов Е. М.//Биоорган. химия. 1981. Т. 7. № 1. С. 25—44.
9. Спасов В. З., Попов Е. М.//Биоорган. химия. 1981. Т. 7. № 3. С. 502—514.
10. Micasini H., Ogihara T., Katahira K., Imai N., Kubahara J., Bumpus F. M., Khosla M. C.//J. Cardiovasc. Pharm. 1987. V. 9. № 2. P. 242—245.
11. Бисеняцке Д. А., Андранс Ю. Е., Мышлякова М. В., Кубрик Г. Г., Порушкевич Е. А., Раткевич М. И., Чипенс Г. И.//Биоорган. химия. 1987. Т. 13. № 2. С. 149—159.
12. Trache G. J., Ackerly J. A., Peach M. J.//J. Cardiovasc. Pharm. 1981. V. 3. № 4. P. 838—846.
13. Howard R. B., Smeby R. R.//Handbook of Hipertention. V. 8/Eds Birkenhäger W. H., Reid I. L. Amsterdam, 1986. P. 389—397.
14. Kirov M. A., Soffer R. L.//J. Biol. Chem. 1989. V. 264. № 7. P. 4138—4142.
15. Tence M., Petip A.//Mol. Cell Endocr. 1989. V. 63. № 1—2. P. 111—119.
16. Capponi A. M., Catt K. I.//J. Biol. Chem. 1980. V. 255. № 24. P. 12081—12086.
17. Rowe B. P., Grove K. L., Saylor D. L., Speth R. C.//Eur. J. Pharmacol. 1990. V. 186. № 2/3. P. 339—342.
18. Chang R. S. L., Lotti V. J.//Mol. Pharmacol. 1990. V. 37. № 3. P. 347—351.
19. Chang R. S. L., Lotti V. J., Chen T. B., Faust K. A.//Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1990. V. 171. № 2. P. 813—819.
20. Speth R. C., Kim K. H.//Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1990. V. 169. № 3. P. 997—1006.
21. Regoli D., Park W. K., Rioux F.//Pharmacol. Revs. 1974. V. 26. № 2. P. 68—123.
22. Peach M. J., Ackerly J. A.//Fed. Proc. 1976. V. 35. № 13. P. 2502—2507.
23. Ramsay D. J.//Frontiers Neuroendocrinol. 1982. V. 7. P. 263—281.
24. Schiavone M. T., Santos R. A. S., Broshihan K. B., Khosla M. C.//Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1988. V. 85. № 11. P. 4095—4098.
25. Prange A. J., Nemeroff C. B., Lipton M. A.//Psychopharmacology: a Generation of Progress. N. Y., 1978. P. 637—652.
26. Harris P. J., Navar L. G.//Amer. J. Physiol. 1985. V. 248. № 5. Pt. 2. P. 621—629.
27. Brown G. P., Douglas J. G., Krontiris-Litowitz J.//Endocrinology. 1980. V. 106. № 6. P. 1923—1931.
28. Freedlender F. E., Goodfriend T. L.//Fed. Proc. 1977. V. 36. № 3. P. 481—490.
29. Terry B. R.//J. Biol. Chem. 1984. V. 259. № 13. P. 8108—8114.
30. Peach M. J., Bumpus F. M., Khairalah P. A.//J. Pharmacol. and Exp. Ther. 1971. V. 176. № 2. P. 366—376.
31. Salman S., Baukal A., Waters S., Bumpus F. M., Catt K. J.//Endocrinology. 1975. V. 97. № 2. P. 275—282.
32. Peach M. J.//Circulat. Res. 1971. V. 28. № 5. Pt. 11. P. 107—117.

Поступила в редакцию
29.IX.1992

После доработки
22.XII.1992

T. V. Gogitidze, E. M. Popov

STRUCTURE-FUNCTIONAL ORGANIZATION OF THE ANGIOTENSIN II MOLECULE. III. THE NATURE OF THE POLYFUNCTIONALITY

Russian Institute for Food Industry, Moscow

Conformational properties of the molecules of angiotensin II and some of its analogs are analysed with regard to the quantitative characteristics of their biological activities. Connections between low-energy conformations of angiotensin II and its biological functions are established. The hormone's spacial structures plausible in terms of interactions with the specific receptors located in smooth muscles and adrenal cortex tissues have been identified.