

УСПЕХИ ФИЗИЧЕСКИХ НАУКФИЗИКА НАШИХ ДНЕЙ

539.121.43

МАГНИТНЫЙ РЕЗОНАНС В БИОЛОГИИ*)

К. Вютрих, Р. Шульман

I. Основные принципы. II. Гемопротейды. III. Миоглобины. IV. Группы гема. V. Гемоглобин.

За последние несколько лет спектроскопия ядерного магнитного резонанса (ЯМР-спектроскопия) высокого разрешения стала мощным средством исследования молекулярной и электронной структуры биологических объектов¹⁻⁵. Недавно появились спектрометры со сверхпроводящими магнитами, обладающие высокой чувствительностью и высоким разрешением; это позволило исследовать ЯМР-спектры новых объектов и извлечь такую информацию, которую невозможно было бы получить другими методами. ЯМР-эксперименты можно проводить в условиях, близких к физиологическим: в водных растворах и при температуре живого организма. В результате часто удается выявить связь между данными о структуре биологических соединений в твердом состоянии, полученными, скажем, при помощи рентгеноструктурного анализа, и соответствующими свойствами молекул в растворах.

В настоящем обзоре рассмотрены некоторые биологические приложения ЯМР-спектроскопии, иллюстрируемые примерами из области исследования гемопротейдов. ЯМР-анализ этого класса железосодержащих белков дал детальное представление о волновых функциях электронов в активных состояниях молекул и способствовал выяснению механизмов реакций, играющих роль в биологических процессах.

I. ОСНОВНЫЕ ПРИНЦИПЫ.

В ЯМР-спектроскопии исследуемый образец помещается в сильное магнитное поле и наблюдаются переходы между уровнями ядерного зеемановского расщепления в радиодиапазоне. В настоящее время из всех ядер наиболее интенсивно изучается протон. Поскольку эксперименты по ЯМР высокого разрешения на протонах проводятся, как правило, с жидкими образцами, положение резонансных линий дает информацию об изотропных составляющих взаимодействия между протонами и ядрами и между протонами и электронами. Иногда из ширины линий и эффекта насыщения

*) К. W ü t h r i c h, R. G. S h u l m a n, *Magnetic Resonance in Biology*, *Phys. Today* 23(4), 43 (1970). Перевод И. М. Беккермана, под редакцией М. В. Волькенштейна.

Курт Вютрих окончил Базельский университет в 1964 г. и в настоящее время работает в Институте молекулярной биологии и биофизики (Цюрих, Швейцария). Эта статья написана им в период работы в лабораториях «Белл телефон».

Роберт Шульман окончил в 1949 г. химический факультет Колумбийского университета. Он возглавляет отдел биофизических исследований лабораторий «Белл телефон» (Меррей-Хилл, Нью-Джерси, США).

Ядерное зеемановское расщепление
в статическом магнитном поле

$$E = -\gamma h H_0 I_z / 2\pi.$$

Гиромангнитное отношение протона: $\gamma/2\pi = 4,260 \cdot 10^3$ гц/гс.

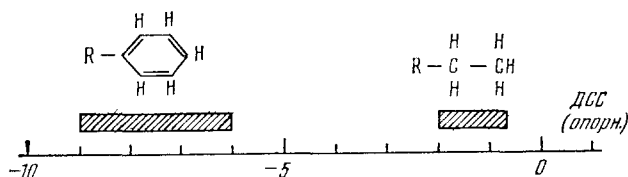
Спиновое квантовое число протона: $I = 1/2$.

$$\Delta E = h\nu/2\pi = \gamma h H_0 / 2\pi \begin{cases} \nu = 60 \text{ Мгц при } H_0 = 14\,000 \text{ гс,} \\ \nu = 100 \text{ Мгц при } H_0 = 23\,500 \text{ гс,} \\ \nu = 220 \text{ Мгц при } H_0 = 51\,700 \text{ гс} \end{cases}$$

Изотропный протонный ЯМР-спектр
диамагнитной молекулы

$$E = -\gamma h H_0 / 2\pi \sum_i (1 - \sigma_i) I_{zi};$$

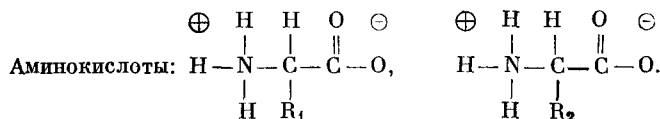
здесь σ_i — изотропная постоянная экранирования i -го протона, малая величина порядка 10^{-6} . Суммирование производится по всем протонам в молекуле. Положения соответствующих резонансов сравниваются с опорным резонансом внутреннего эталонного соединения, функции которого в биологических исследованиях обычно выполняет ДСС (2,2-диметил-2-силапентан-5-сульфоновая кислота).



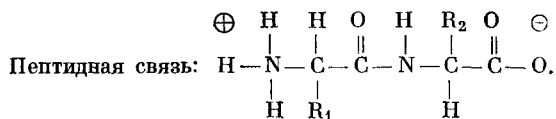
Магнитное поле

(отклонение от опорной линии, млн. доли)

Аминокислоты и белки

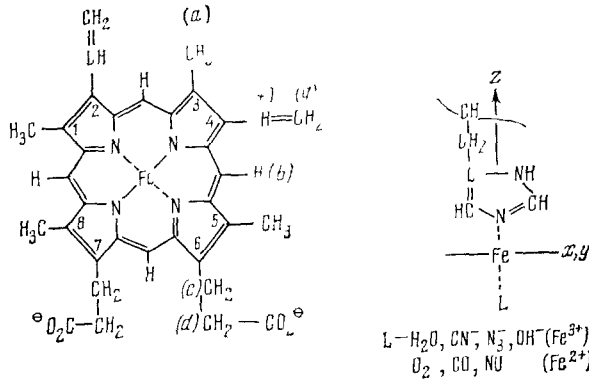


В природных белках существуют в общей сложности 20 различных аминокислот. Здесь группа, обозначенная символом R_i , является либо алифатическим, либо ароматическим заместителем.



Аминокислоты посредством пептидных связей образуют полипептиды, которые состоят из хребта (остова) с различными боковыми цепями R_i

Гемогруппа миоглобина и гемоглобина



В этой группе гема, которая представляет собой комплекс атома трехвалентного железа и протопорфиринового кольца (иногда называемый «протогемом IX»), железо связано с четырьмя атомами азота в плоскости порфиринового кольца. Пятый атом азота относится к гистидилу полипептида. Шестая координационная связь атома железа является частью активного центра молекулы, где осуществляется связывание кислорода и других небольших молекул (например, CO или CN⁻) в качестве лигандов железа. Здесь показаны следующие заместители в гемогруппе: метильные группы кольца (a), мезопроtons (b), пропионаты (c, d), 2,4-винильные группы (f, g).

Группы гема цитохромов и других гемопротеидов имеют весьма сходные молекулярные структуры

Степень окисления и спиновое состояние атома железа гемогруппы

Степень окисления:	Fe ²⁺	Fe ²⁺	Fe ³⁺	Fe ³⁺
Спиновое состояние:	S=2	S=0	S=5/2	S=1/2

Электронная структура:	Fe ²⁺	Fe ²⁺	Fe ³⁺	Fe ³⁺
	↑ ↑ ↑ ↑	— — — —	↑ ↑ ↑ ↑	— — — —
	↑ ↑ ↑	↑↓ ↑↓ ↑↓	↑ ↑ ↑	↑ ↑↓ ↑↓

T _{1e} , сек	—	2·10 ⁻¹⁰	2·10 ⁻¹²	
Примеры:	Mb Hb	MbO ₂ HbO ₂	Mb(H ₂ O) Hb(H ₂ O)	MbCN HbCN.

T_{1e} — время продольной спин-электронной релаксации, Mb — деоксимиоглобин, MbO₂ — оксимиоглобин, Mb(H₂O) — ферримиоглобин, MbCN — дианферримиоглобин, Hb — деоксигемоглобин и т. д.

Миоглобин и гемоглобин

Молекула миоглобина состоит из полипептидной цепи, в состав которой входят 153 аминокислотных остатка, и одной группы протогема IX. Молекулярный вес ее 18 000. В каждой молекуле имеется около 1000 протонов, из которых 30 связаны с протогемом IX, а два — с кольцом аксиального остатка гистидина. Миоглобин может присоединять одну молекулу кислорода.

Гемоглобин состоит из четырех субъединиц, по две типов α и β. В состав каждой субъединицы входят одна полипептидная цепь приблизительно из 150 аминокислотных остатков и одна группа протогема IX. Молекулярный вес 65 000. В каждой молекуле имеются 3500 протонов, из них 128 принадлежат молекулам, непосредственно связанным с атомами железа. Одна молекула гемоглобина присоединяет четыре молекулы кислорода к четырем атомам железа

резонансов удается получить сведения и об анизотропном взаимодействии. Так как все эти взаимодействия теснейшим образом связаны с молекулярной структурой и так как протоны входят в состав практически всех органических и биологических соединений, протонная ЯМР-спектроскопия высокого разрешения широко используется для структурных исследований.

1. А п п а р а т у р а

Ядерный резонанс можно наблюдать, либо изменяя поляризуемое магнитное поле при фиксированной радиочастоте (развертка по полю), либо, наоборот, изменяя частоту при постоянном поле (развертка по частоте). Большинство спектрометров работает с магнитными полями, напряженность которых соответствует частотам протонного резонанса 60, 100 и 200 Мгц. Поскольку разность между положениями резонансных линий для различных протонов пропорциональна приложенному полю (см. таблицу), при больших полях существенно возрастает разрешение, а, кроме того, чем сильнее намагничивание образца, тем выше чувствительность метода.

Для биологических исследований сейчас широко применяются серийные приборы (например, Varian HR-220) со сверхпроводящими соленоидами для создания поляризуемого магнитного поля, работающие на частоте 220 Мгц. Однородность поля и временная стабильность его в зоне расположения образца составляют в этих приборах 10^{-9} ; столь высоких параметров удается добиться при помощи шиммирующих катушек и быстрого механического вращения трубки с образцом. Спектрометр HR-220 работает на постоянной частоте с разверткой по полю для снятия спектра. Объекты могут исследоваться при любой температуре от -60 до 150° С.

Во многих биологических экспериментах возникает необходимость улучшить отношение сигнал/шум, воспользовавшись для этой цели ЭВМ среднего быстродействия и проводя наблюдения в течение нескольких часов.

2. Д и а м а г н и т н ы е м о л е к у л ы

В органической молекуле каждый протон экранирован от внешнего магнитного поля своим химическим окружением: другими атомами, входящими в состав молекулы, собственными и близлежащими химическими связями, а также молекулами растворителя. В результате несколько изменяются условия резонанса по сравнению с резонансом индивидуальных, изолированных протонов — наблюдается так называемый химический сдвиг. Его определяют путем сопоставления с положением резонансных линий у стандартных, эталонных соединений (см. таблицу). В экспериментах с разверткой по полю, т. е. при постоянной радиочастоте, все протонные резонансы диамагнитных органических молекул наблюдаются при меньших значениях поля, чем опорные сигналы, причем сдвиг не превышает ~ 10 миллионных долей (м. д.). Например, у алифатических углеводородов сдвиг составляет от $-0,5$ до $-2,0$ м. д., у ароматических молекул от $-6,0$ до $-8,5$ м. д. Для малых органических молекул время спинрешеточной (продольной) релаксации T_1 и времена спин-спиновой (поперечной) релаксации T_2 довольно велики — они лежат в диапазоне от 1 до 20 сек, так что наблюдаемые ширины линий определяются скорее разрешающей способностью приборов, чем этой релаксацией. Однако в больших молекулах, которые вращаются медленнее, ядерное дипольное взаимодействие приводит к значительному уширению линий ЯМР.

3. Парамагнитные молекулы

На протонный ЯМР-спектр парамагнитных молекул оказывают существенное влияние взаимодействия протонов с неспаренными электронами. Эти взаимодействия, включающие в себя изотропное и анизотропное сверхтонкие взаимодействия, а также дипольные эффекты, могут вызвать и сдвиг, и уширение резонансных линий по сравнению с линиями индивидуальных протонов. Линии ЯМР, сдвиг которых обусловлен взаимодействием с неспаренными электронами, мы называем линиями сверхтонкого сдвига. Легко показать, что эти сдвиги зависят от поляризации электронных спинов и потому величина их в парамагнитных молекулах обратно пропорциональна абсолютной температуре.

Сверхтонкие сдвиги линий ЯМР можно обычно связать с плотностью электронных спинов и таким образом получить детальную информацию об электронной структуре молекулы. Ширины линий также зависят от силы взаимодействия, но, кроме того, они зависят и от времени корреляции данного взаимодействия. Последнее можно определить из времени спин-решеточной релаксации электронов или из времени переориентации (перевоса) молекул, причем в каждом случае требуется особый анализ. В общем случае, когда время корреляции уменьшается, магнитные электроны вносят меньший вклад в ширину линии ЯМР и разрешение возрастает.

II. ГЕМОПРОТЕИДЫ

Гемопротеиды принимают участие во многих процессах жизнедеятельности живого организма. Так, гемоглобин забирает кислород в легких и с током крови переносит его мышцам и мозгу. Миоглобин связывает и запасает кислород в мышцах. Множество различных цитохромов, также являющихся гемопротеидами, служат переносчиками электронов в окислительно-восстановительных реакциях, осуществляемых в дыхательной цепи. В ходе этих реакций (ведущих в конечном счете к восстановлению кислорода) высвобождается энергия, которая затем может быть использована организмом. Ряд других гемопротеидов играет роль ферментов, регулирующих многочисленные биохимические реакции. Таким образом, эти соединения выполняют самые разнообразные биологические функции.

1. Структурные единицы

Аминокислоты, объединяющиеся в длинные нити — так называемые полипептидные цепи, — представляют собой основные структурные единицы белков. Эти полипептидные цепи в типичных белках содержат сотни аминокислотных остатков, т. е. их молекулярные веса составляют десятки тысяч. Как показали рентгеноструктурные исследования монокристаллов белков, полипептидные цепи имеют весьма своеобразное пространственное расположение. Эти молекулы имеют фиксированную трехмерную структуру благодаря множеству слабых связей: водородных и ионных связей, а также ван-дер-ваальсовых взаимодействий.

В гемопротеидах одна или несколько групп гема (см. таблицу) размещаются в полостях, образующихся в трехмерной структуре полипептидных цепей. Они присоединяются к последним посредством небольшого числа ковалентных или координационных связей и множества более слабых взаимодействий. Группа гема состоит из порфиринового кольца, представляющего собой систему конъюгированных ароматических колец, и иона железа. Этот ион может находиться в различных валентных и спиновых состояниях. Соответственно гемопротеиды могут быть либо диа-, либо парамагнетиками.

К примеру, в физиологически нормальных миоглобине и гемоглобине, когда к ним присоединен кислород, железо группы гема находится в диамагнитном, низкоспиновом двухвалентном состоянии, в белке, не присоединившем кислород, — в высокоспиновом двухвалентном состоянии. Переход между трех- и двухвалентным состояниями железа служит важным фактором в биологической функции цитохромных соединений. При структурных исследованиях нетрудно изменить состояние железа группы гема посредством химических реагентов.

2. Активные центры

Во всех гемопротеидах группа гема представляет собой часть активного центра и, следовательно, непосредственно влияет на биологическую функцию молекулы. И хотя группы гема в различных гемопротеидах совершенно аналогичны по своей молекулярной структуре, специфическое взаимодействие между ними и полипептидными цепями приводит к различной химической активности железа группы гема, что в свою очередь обуславливает ту или иную биологическую роль соответствующего гемопротеида.

Протонная ЯМР-спектроскопия высокого разрешения позволяет получить информацию об этом взаимодействии гем — полипептид. Кроме того, метод ЯМР дает сведения о структурных изменениях, происходящих при биохимических реакциях, например — присоединения кислорода к миоглобину или гемоглобину, а затем эти данные можно сопоставить с результатами рентгеноструктурных исследований на монокристаллах.

III. МИОГЛОБИНЫ

На рис. 1 воспроизведены в различных горизонтальных и вертикальных масштабах три области ЯМР-спектра цианферритмиоглобина MbCN; здесь представлены все наблюдаемые резонансные линии. Уже из изложенных выше общих соображений нетрудно понять многие характерные особенности этого спектра. Резонансные линии почти всех 950 протонов полипептидной цепи приходятся на диапазон от $-0,5$ до $-9,0$ м.д. Медленное вращение молекул приводит к тому, что благодаря ядерному дипольному взаимодействию линии резонанса индивидуальных белковых молекул уширяются примерно до $20-40$ гц и соответствующая спектральная область оказывается недостаточно разрешенной даже при 220 Мгц.

Как показывает сопоставление с ЯМР-спектрами индивидуальных аминокислот, резонансы в области между $-0,5$ и $-3,0$ м.д. обусловлены преимущественно остатками алифатических аминокислот. Резонанс между $-3,0$ и $-4,0$ м.д. принадлежит протонам «хребта» (остова) полипептидной цепи, а между $-6,0$ и $-9,0$ м.д. — остаткам ароматических аминокислот и протонам недефтерированных амидов. Острые пики между $-4,0$ и $-6,0$ м.д. представляют собой резонанс группы Н₂O и его спутники, возникающие в результате вращения образца в спектрометре.

Относительные интенсивности сигналов в различных участках спектра находятся в удовлетворительном согласии с теми, которых можно ожидать, исходя из известного аминокислотного состава миоглобина дельфина. Участок между $-0,5$ и $-9,0$ м.д. для различных белков с молекулярными весами от 10 000 до 25 000 весьма напоминает тот, что изображен на рис. 1. Как будет показано ниже, анализ спектра позволяет получить более важную информацию о значении специфических полипептидных резонансов.

Поскольку участок между опорным сигналом эталонного соединения ДСС (2,2-диметил-2-силапентан-5-сульфовая кислота) и -9 м.д. спектра белка оказывается недостаточно разрешенным, большую часть структурной информации получают из резонансов в других областях спектра. Так как $MbCN$ является парамагнитным соединением и имеет очень малое

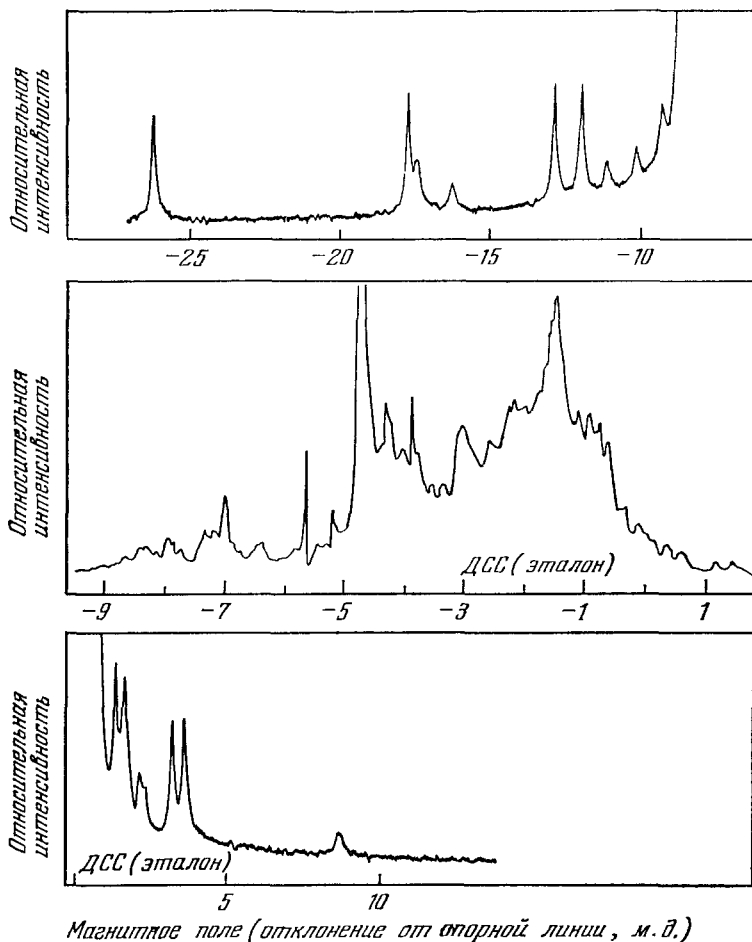


Рис. 1. Протонный ЯМР-спектр раствора цианферритмиоглобина ($MbCN$) дельфина в D_2O при частоте поляризующего поля 220 Мгц.

Для участков спектра от $+1$ до -9 м. д., от $+1$ до $+10$ м. д. и от -10 до -30 м. д. использованы различные масштабы горизонтальных и вертикальных шкал. Острые пики на участке между $-3,8$ и $-6,0$ м. д. соответствуют резонансу H_2O , а его спутники обусловлены вращением трубки с образцом.

время спин-решеточной релаксации, протонные резонансы этих молекул, связанных с ионом железа, смещаются, но не испытывают заметного уширения в результате взаимодействия с неспаренными электронами. В итоге в области от линии ДСС вплоть до -10 м. д. наблюдаются хорошо разрешенные резонансы, интенсивности которых соответствуют одному, двум или трем протонам. Путем измерения интенсивности этих сигналов и сравнения их с резонансами изолированных групп гема и миоглобинов, в которых протоном IX (см. таблицу) был заменен другими группами гема, удалось связать резонансы сверхтонкого сдвига $MbCN$ со специфическими протонами гема и аксиального гистидина (рис. 1 и 2).

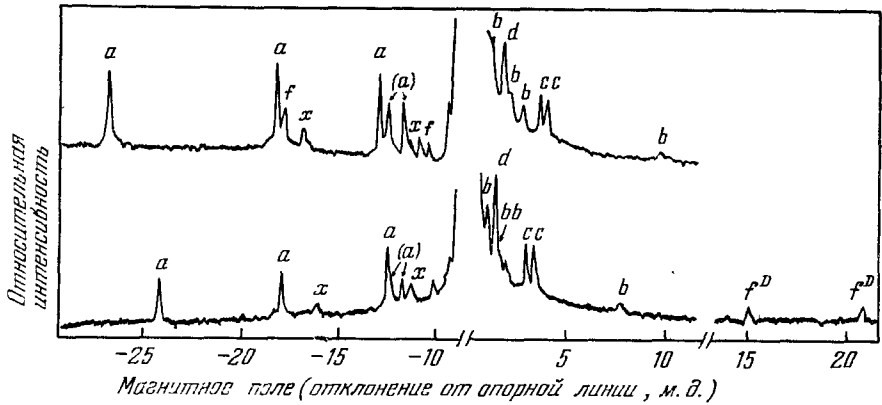


Рис. 2. Сравнение спектров (снятых при частоте 220 Мгц и температуре 25° С) нативного цианферримоглобина кашалота (вверху) и реконструированного циандейтероферримоглобина (внизу), у которого в группе гема вместо винильных остатков заместителями являются радикалы — Н (см. таблицу).

Резонансы соответствуют следующим протонам гема: *a* — протонам метильных групп кольца; *b* — мезопротонам; *c*, *a* — метиленовым протонам группы пропионовой кислоты; *f* — протонам радикала — СН винильных групп; *f^D* — 2,4-протонам в дейтерированном МбСN; *x* — протонам аксиального остатка гистидила. Резонансы *f* были идентифицированы по их отсутствию в дейтерированном МбСN, все другие — по их интенсивностям и наличию в обоих спектрах.

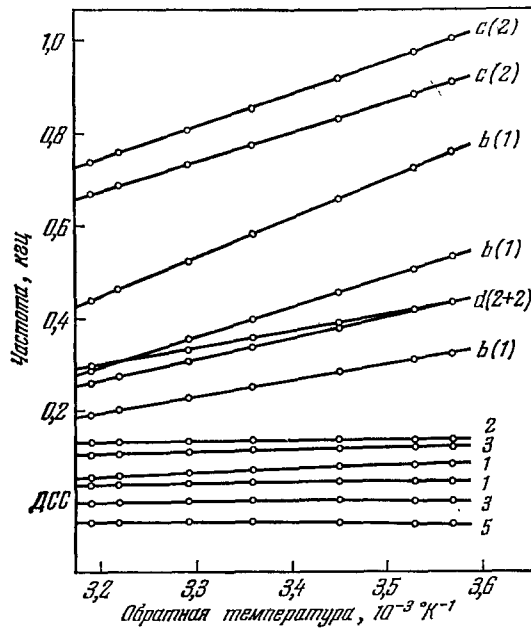


Рис. 3. Положение резонанса в зависимости от обратной температуры кашалота в диапазоне от -1 до +4 м. д. (1 м. д. = 220 гц).

Резонансы сверхтонкого сдвига, благодаря их температурной зависимости, могут быть отделены от линий химического сдвига, обусловленного кольцевыми токами. Справа указано число протонов, соответствующих интенсивностям и значениям сдвинутых резонансов, которые можно видеть на рис. 2.

1. Кольцевые токи

В спектре, представленном на рис. 1, наряду с линиями, химический сдвиг которых зависит от температуры, имеются также резонансы (при напряженностях поля выше $-0,5$ м.д.) с иным, не зависящим от температуры механизмом сдвига. Этот механизм присущ спектрам большинства белков, так как даже в отсутствие парамагнитных центров протонные резонансы аминокислотных остатков смещаются локальными магнитными полями окружающих групп.

Наиболее сильные из этих локальных полей обусловлены так называемыми кольцевыми токами в ароматических кольцах, а именно в остатках ароматических аминокислот и группах гема. Кольцевые токи возникают в результате того, что если к молекуле ароматического соединения приложено внешнее магнитное поле, перпендикулярное ее плоскости, то π -электроны испытывают ларморовскую прецессию в замкнутом кольце сопряженных связей. Создаваемое кольцевыми токами магнитное поле частично ослабляет внешнее поле над и под плоскостью молекулы и усиливает его в других местах. Таким образом, если остаток алифатической аминокислоты оказывается вблизи плоскости одного или нескольких ароматических колец в трехмерной структуре белковой молекулы, ее протонные резонансы могут быть смещены в область более сильных полей, чем у ДСС, и станут хорошо разрешенными (рис. 1 и 3). Сдвиги, обусловленные кольцевыми токами, весьма чувствительны к расположению наблюдаемых протонов относительно ароматических колец и, следовательно, к структурным изменениям в белках.

Резонансы группы гема ферримноглобина, находящегося в высокоспиновом состоянии, у которого шестая координационная связь железа занята молекулой воды, имеют значительно больший сверхтонкий сдвиг и значительно более широкие линии, чем в спектре цианферримноглобина. Этого следовало ожидать, поскольку в первом случае имеет место больший суммарный электронный спин и большее время электронной релаксации. Для дезоксимноглобина (восстановленный миоглобин), где шестая координационная связь двухвалентного железа в группе гема не занята, сверхтонкие сдвиги происходят как в сильных, так и в слабых полях. Эти сдвиги сравнимы по величине со сдвигами в цианферримноглобине (см. рис. 1), но линии несколько шире.

2. Связывание кислорода

Для парамагнитного дезоксимноглобина наблюдались как резонансы сверхтонкого сдвига, так и химические сдвиги, обусловленные кольцевыми токами; что же касается диамагнитного оксимноглобина, то все разрешенные резонансы в нем сдвигаются полями кольцевых токов. Чтобы понять биологическую функцию миоглобина, особенно важно определить структурные изменения, возникающие под влиянием связывания кислорода.

Воспользовавшись рентгеноструктурными параметрами миоглобина, которые были определены Дж. Кендрию и его сотрудниками, а также эмпирическими выражениями для моделирования локальных полей, создаваемых кольцевыми токами, мы рассчитали приблизительное положение линий ЯМР различных аминокислотных остатков. Сопоставление этих расчетов с экспериментальными спектрами показало, что структуры белков в монокристаллах и в растворах совершенно идентичны.

Далее, некоторые разрешенные резонансы, сдвинутые кольцевыми токами, могут быть приписаны специфическим аминокислотным остаткам, расположенным вблизи гема. Сравнение положений этих резонансов

в спектрах окси- и дезоксимиоглобина показало, что оксигенация изменяет структуру молекулы миоглобина. Хотя эти изменения могут оказываться слишком незначительными, чтобы их удалось разрешить рентгеноструктурными исследованиями (согласно данным ЯМР-спектроскопии они порядка 0,2 Å), в ЯМР-спектре они проявляются в виде сдвига, превышающего 100 *гц*.

IV. ГРУППЫ ГЕМА

Электронную структуру гема можно описать волновыми функциями молекулярных орбиталей, охватывающими все атомы системы конъюгированных колец, включая атом железа. Оказывается, что в парамагнитных группах гема неспаренные электроны смещены от железа в порфириновое кольцо. Далее, в результате поляризации спиновой системы или дополнительной дополяризации спиновой системы плотность неспаренных электронов еще более перемещается от атомов углерода, входящих в состав кольца, к непосредственно связанным протонам или к группам CH_3 и CH_2 (см. таблицу). Возникающие в результате сверхтонкие сдвиги протонных резонансов пропорциональны плотности неспаренных электронов у ближайшего углеродного атома кольца. Таким образом, если протонные резонансы обусловлены специфическими протонами группы гема, по ним можно последовательно проследить за распределением неспаренных электронов во всей группе гема.

1. Низкоспиновые группы гема с ионом трехвалентного железа

Неспаренные электроны в низкоспиновых группах гема с ионом трехвалентного железа локализованы в молекулярных орбиталях π -типа. Изотропная часть тензора сверхтонкой связи A_i , количественно измеряемая в ЯМР-экспериментах, как было установлено, зависит от спиновой плотности ρ_c^π в углеродных атомах кольца следующим образом:

$$A_i = Q\rho_c^\pi,$$

где $Q \approx -6,3 \cdot 10^7$ *гц* для непосредственно связанных протонов и $Q \approx +3,0 \cdot 10^7$ *гц* для протонов метильных групп. В дальнейшем речь будет идти о резонансах четырех метильных групп кольца, которые дают представление о плотностях спиновых систем у четырех соседних атомов углерода в гемогруппе (см. таблицу). К тем же выводам привело изучение других протонных резонансов. Если все заместители у порфиринового кольца идентичны, молекула обладает симметрией 4-го порядка. Соответственно исследование ЯМР-растворов (в различных растворителях) дицианферрипорфина,

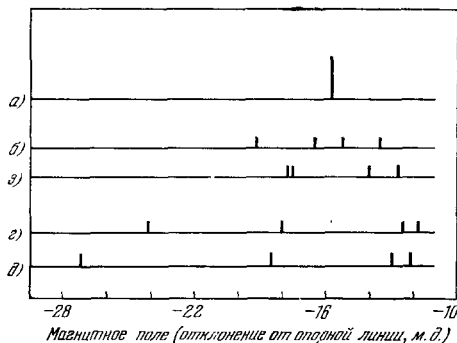


Рис. 4. Положение протонных резонансов метильной группы кольца комплексов дициан-железа(III) порфина (а), дейтеропорфина (б), протопорфина (в), а также дейтерированного MbCN (г) и нативного цианферримиоглобина MbCN (д).

Сдвиги ЯМР-линий для реконструированных метильных групп в порфине были вычислены по сдвигам, наблюдавшимся для протонов, связанных с углеродными атомами кольца.

в котором все заместители в геме являются протонами, показало, что электронные плотности у всех углеродных атомов кольца, от 1-го до 8-го,

одинаковы. Как можно видеть на рис. 4, наблюдаются лишь слабые возмущения симметрии 4-го порядка, обусловленные различными заместителями в различных группах гема в растворе. В гемопротеидах, однако, взаимодействия гема с полипептидными цепями вызывают изменение как общей протяженности области деполяризации спиновой системы от атома железа до порфиринового кольца, так и симметрии распределения спинов (рис. 4).

Эти взаимодействия, как оказалось, весьма специфичны и более сильно влияют на плотности спиновых систем, чем вид заместителей в геме. Изменения электронной структуры гема, по-видимому, обусловлены взаимодействиями с аминокислотными остатками, которые либо находятся в координационной связи с атомом железа, либо непосредственно взаимодействуют с порфириновым кольцом.

2. Структура и биологическая функция

Биологическая функция белковой молекулы в значительной мере определяется ее химической реактивностью по отношению к другим молекулам. Хотя реактивность гемопротеидов тесно связана с реактивностью

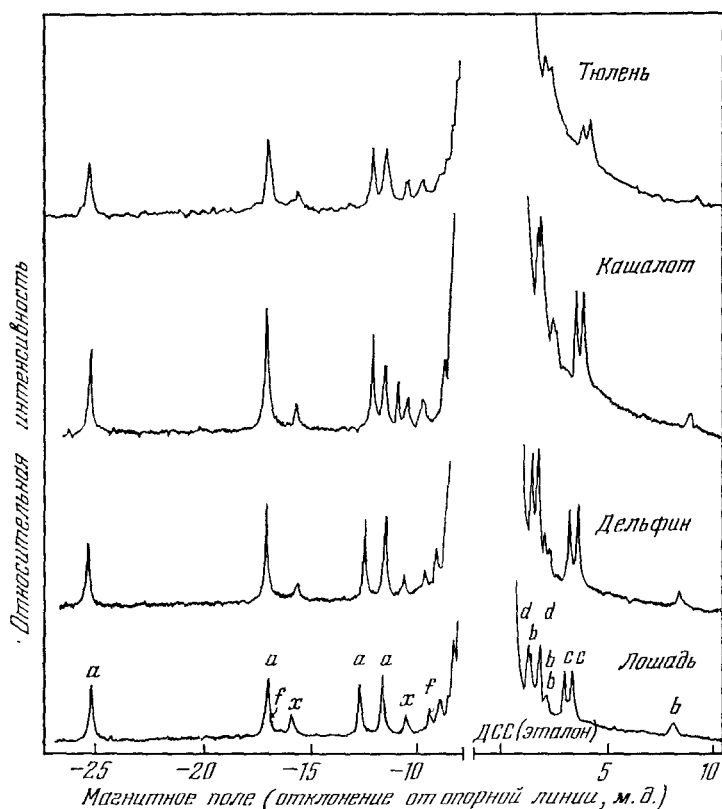


Рис. 5. Резонансы сверхтонкого сдвига цитохромсодержащих гемоглобинов различных животных. Гемогруппа всех этих миоглобинов представляет собой протогем IX, однако число аминокислотных остатков в полипептидных цепях различно.

групп гема, последняя существенно отличается от реактивности изолированных гемов, которые сами по себе не способны выполнять ни одной из функций, свойственных известным гемопротеидам. Чтобы выяснить

механизмы действия гемопротейдов, интересно попытаться сопоставить полученные при помощи ЯМР-исследований сведения об электронных структурах гемов и гемопротейдов с их химической реакционной способностью и биологической функцией.

Ряд наблюдений свидетельствует о том, что специфические модификации электронной структуры гема есть проявление важных функций полипептидных цепей в гемопротейдах. Были обнаружены характерные различия между электронными структурами изолированных гемов и групп гема в гемопротейдах (см. рис. 4). Более того, у гемопротейдов, обладающих различными биологическими функциями, например у миоглобина, гемоглобина и цитохрома С, электронные структуры гема также различаются между собой. Вместе с тем оказалось, что миоглобины различных млекопитающих, непременно содержащие протогем IX, но имеющие различные полипептидные цепи, обладают существенно идентичными распределениями спинов (рис. 5). Аналогичные результаты были получены при сравнительном изучении других гемопротейдов у животных различных биологических видов. Это свидетельствует о том, что как биологическая активность, так и электронная структура гема не изменились в значительной степени под влиянием тех мутаций, которые в процессе эволюции изменили строение полипептидных цепей. Поскольку идентичными оказываются лишь ограниченные участки полипептидных цепей данных гемопротейдов у различных биологических видов, из приблизительного постоянства электронных структур гемов следует, что наиболее важную роль в гемополлипептидных взаимодействиях играют аминокислотные остатки.

Хотя электронная структура групп гема может быть лишь одним из многих факторов, определяющих биологическую функцию гемопротейда, весьма интересно исследовать ее влияние.

В настоящее время нетрудно изучить и биохимическое действие и электронную структуру групп гема для самых разнообразных гемопротейдов, поэтому имеется возможность выяснить детальную взаимосвязь между тем и другим.

V. ГЕМОГЛОБИН

Исследования миоглобина позволили использовать те же методы для изучения значительно более сложной молекулы гемоглобина. Из-за ее больших размеров количество наблюдаемых у нее протонных резонансов превосходит количество их у миоглобина, причем отдельные резонансы шире и сильнее перекрываются. И все же сохраняется возможность наблюдать резонансы сверхтонкого сдвига у цианферригемоглобина и идентифицировать их, по крайней мере частично, со специфическими протонами групп гема.

К о о п е р а т и в н о е с в я з ы в а н и е к и с л о р о д а

Осуществляя свою биологическую функцию, гемоглобин присоединяет к каждой из четырех своих групп гема по одной молекуле кислорода. Давно уже установлено, что связывание кислорода или других лигандов с гемоглобином имеет «кооперативный» характер. Это значит, что сродство к кислороду или другим лигандам у частично связанных гемоглобинов, образованных путем присоединения одной, двух или большего числа лигандных молекул, сильнее, чем у дезоксигемоглобина. Возникает вопрос о механизме, ответственном за свободную энергию взаимодействия между субъединицами, которые участвуют в кооперативной связи.

Выше были описаны ЯМР-эксперименты, выявившие те структурные изменения, которые происходят при оксигенации миоглобина. Поскольку структуры миоглобина и индивидуальных субъединиц гемоглобина весьма сходны, можно сделать вывод, что присоединение лиганда должно вызывать соответствующие структурные преобразования внутри этих субъединиц. Чтобы понять кооперативный характер присоединения лиганда к гемоглобину, важно показать, насколько далеко эти структурные преобра-

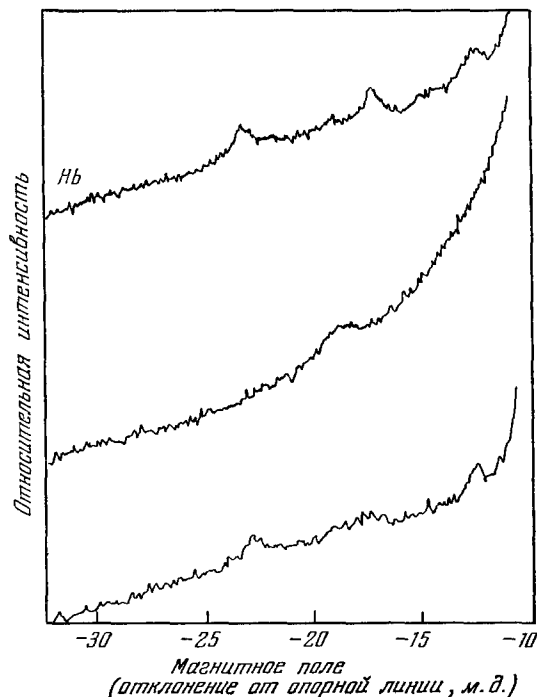


Рис. 6. Сравнение резонансов сверхтонкого сдвига при слабых полях для дезоксигемоглобина Hb (лигандные связи отсутствуют), полностью насыщенного ферригемоглобина HbO₂ (в середине) и частично насыщенного гемоглобина Hb(α₂(βO₂)₂) (внизу). Видно, что спектр частично насыщенного гемоглобина представляет собой суперпозицию спектров Hb и Hb(H₂O). Эти спектры были сняты в течение нескольких часов с использованием ЭВМ среднего быстрого действия.

зования простираются по всей молекуле. Влияют ли они на близлежащие группы гема и изменяют ли, таким образом, сродство к кислороду или же сказываются только на белковой части? Ответ на этот вопрос был получен в ЯМР-экспериментах, выполненных в последнее время.

Если бы заметная часть возрастающей свободной энергии лигандной связи, относящаяся к взаимодействию субъединиц, вызвала изменения в электронной структуре групп гема, протонные резонансы сверхтонкого сдвига у гемоглобина, частично присоединившего лиганд, были бы иными, чем у полностью насыщенного или свободного. Исследования ЯМР для серии частично присоединивших лиганд форм гемоглобина показали, что лигандная связь не влияет на группу гема близлежащих субъединиц.

В типичных экспериментах сопоставлялись резонансы (в слабых полях) свободного дезоксигемоглобина Hb и полностью насыщенного ферригемоглобина HbO₂ с резонансами частично присоединивших лиганд форм Hb(α₂(βO₂)₂). На рис. 6 можно видеть, что спектр частично насыщенного гемоглобина представляет собой суперпозицию спектров Hb

и HbO_2 ; следовательно, никакого влияния лигандной связи на электронную структуру групп гема в соседних субъединицах не было обнаружено, несмотря на то, что частично насыщенная форма имеет большее сродство к кислороду, чем форма Hb . С другой стороны, согласно данным ЯМР-спектроскопии лигандная связь вызывает структурные изменения как в гемоглобине, так и миоглобине. Это означает, таким образом, что взаимодействие субъединиц в гемоглобине сопровождается перегруппировкой в пептидной цепи, а не обусловлено прямыми гем — гем-взаимодействиями.

Изучение гемопротеидов — один из многих примеров, которыми можно иллюстрировать применение ЯМР-спектроскопии высокого разрешения в биологии. В сочетании с различными химическими и физическими методами она позволяет идентифицировать резонансы специфических протонов в ЯМР-спектрах многочисленных биологических молекул и на этой основе изучать их структуру в тех или иных условиях. В работах ^{3,4} содержится обзор многих из этих экспериментов.

Весьма обнадеживающим является объем той новой информации о структуре различных биологических молекул в растворах, которую удалось получить из ЯМР-экспериментов за последние несколько лет. Возможности спектрометров высокого разрешения и дальнейшее усовершенствование аппаратуры, в частности повышение скорости накопления данных путем фурье-преобразования и применение еще более сильных поляризующих полей, делает ЯМР-спектроскопию одним из основных методов структурных исследований биологических объектов.

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. F. A. Nelson, H. E. Weaver, *Science* **146**, 223 (1964).
 2. F. A. Bovey, *Chem. Eng. News* **43** (No. 35), 98 (1965).
 3. C. C. McDonald, W. D. Phillips, *Proton Magnetic Resonance Spectroscopy of Proteins*, в сборнике *Biological Macromolecules* (G. D. Fasman, and S. N. Timasheff, Eds.), vol. 3 (будет опубликовано).
 4. G. C. K. Roberts, O. Jardetzky, *Adv. Protein Chem.* **24**, 448 (1970).
 5. Более детально наши исследования изложены в работах: *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **60**, 373; **61**, 1199 (1968); **62**, 637 (1969); *Science* **165**, 251 (1969).
-