

КРИСТАЛЛИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА «ГЛОБУЛЯРНЫХ» ПРОТЕИНОВ

А. И. Китайгородский

Уже давно известно, что ряд протеинов образует хорошие монокристаллы, размеры которых вполне достаточны для производства полного рентгеноструктурного исследования. Задача эта, однако, весьма сложна. Монокристаллы трудно поддерживать во время всего исследования в неизменном состоянии. Особые трудности возникают также из-за того, что элементарные ячейки кристаллов исключительно велики, и поэтому интерференционные пятна на рентгенограмме при обычной съёмке расположились бы исключительно тесно и в близости первичного пятна.

Несмотря на указанные трудности, число исследованных протеинов достаточно велико, о чём свидетельствует таблица. Среди этих объектов особенно подробно были изучены инсулин, лактоглобулин и гемоглобин. Для этих соединений, кроме измерений элементарной ячейки и пространственной группы, был проведён анализ интенсивностей рентгеновских рефлексов.

Как видно из таблицы (см. след. стр.), для большинства веществ измерения проведены для влажных и сухих кристаллов. Существование кристаллов протеинов в этих двух формах — с кристаллизационной жидкостью и без неё — является интересной особенностью этих веществ. Это же обстоятельство, как будет видно ниже, оказывает важную услугу в решении основных вопросов структуры протеинов.

Исследование влажных кристаллов производится в специальных капиллярных трубках, изготавливаемых из пронцаемого для рентгеновских лучей боросиликатного стекла. Толщина стенок капилляра должна быть около 0,01 мм, сечение 1 мм, длина 30 мм. Кристалл протеина вводится в капилляр вместе с каплей маточного раствора. При помощи тоненькой шерстяной нитки в оба конца капилляра вводится жидкость. Кристалл остаётся посередине между двумя 10-миллиметровыми столбиками жидкости и так как он влажный, то прилипает к стенке. С обоих концов капилляр заклеивается плицеином. Таким образом, кристалл остаётся в равновесии со своей

Протеин	Молекулярный вес (не рентгеновские данные)	Сухой или влажный	a (в Å)	b	c	β (в градусах)
Рибонуклеаза (орто-ромбическая)	13 000	влажный				
	15 000	сухой	36,6	40,5	52,3	90
Рибонуклеаза (моноклинная)	13 000	влажный	30,8	38,5	53,5	107
	15 000	сухой	28,7	29,3	45,2	100
Инсулин	35 100	влажный	144	83	34	90
	40 900	сухой	130	74,8	30,9	90
Лактоглобулин (табулярная форма)	37 900	влажный	67,5	67,5	154	90
	41 800	сухой	60	63	110	90
Локтоглобулин (игольчатая форма)	37 900	влажный	67,5	67,5	133,5	90
	41 800	сухой	56	56	130	90
γ-химотрипсин	27 000	влажный	69,5	69,5	97,5	90
		сухой	63,0	63,0	74,5	90
Химотрипсин	41 000	влажный	49,6	67,8	66,5	102
		сухой	45	62,5	57,5	112
Пепсин	35 500	влажный	116	67	461	90
		сухой				
Метгемоглобин лошади	39 200 66 700	влажный	109	63,2	54,4	112
		сухой	102	51	47	130
Альбумин сыворотки лошади	70 000	влажный	96,7		145	120
		сухой	74,5		130	120
Глобулин табачного сока	73 000 (300 000)	влажный	123	123	123	90
		сухой	123	123	123	90
Эксельцин	294 000	влажный	149	86	208	90
		сухой	149	86	208	90
Томатный вирус	7 600 000 10 600 000	влажный	394	394	394	90
		сухой	318	318	318	90

Таблица

$c \sin \beta$	Объём в Å^3	n	Объём на одну молекулу	Плот- ность	Молеку- лярный вес	Молеку- лярный вес, исправл. на ост. воду	Прост- ранств. группа	Наименьшее на- блюд. межплоск. расстояние
52,3	77 300	4	19 300	1,341	15 700	13 700	$P2_12_12_1$	2
51	60 000	2	30 000				$P2_1$	2
44,5	37 400	2	18 700				$P2_1$	3,7
34	404 000	6	67 000	1,28	52 400		$R3$	2,4
30,9	298 000	6	50 000	1,315	39 500	37 400	$R3$	7
154	702 000	8	88 000	1,257	67 000		$P2_12_12_1$	2,4
110	416 000	8	52 000	1,27	40 000		$P2_12_12_1$	20
133,5	608 000	8	76 000				$P4_23_1$	20
130	408 000	8	51 000	1,30	40 100			
97,5	471 000	8	58 900					
74,5	298 000	8	37 200	1,33	30 100		$P4_22_1$	2,5
65	219 000	2	109 000	1,277	84 500		$P4_22_1$	10
53,5	151 000	2	75 500	1,31	60 000		$P2_1$	2
461	3 580 000	54	66 500	1,32	53 000		$P2_1$	5
50,7	352 000	2	176 000	1,242	132 000	54 000	$C2$	2
36	188 000	2	94 000	1,27	72 000	66 700	$C2$	13
	1 170 000	6	195 000	1,27	150 000		H	4
	610 000	6	102 000	1,34	82 800		H	20
123	1 860 000	4	465 000	1,287	362 000	322 000	F	
208	2 670 000	6	445 000	1,317	350 000	305 800	$R3$	
394	61 000 000	2	30 500 000	1,286	24 000 000		I	
318	32 000 000	2	16 000 000	1,35	13 000 000		I	

жидкостью и в то же время рентгеновские лучи проходят только через кристалл. Если эти предосторожности не будут приняты, то кристалл будет разрушаться во время съёмки.

Гораздо труднее готовить сухие кристаллы. Они трескаются, из-за того, что между мозаичными блоками выкристаллизовывается соль. Хорошие образцы получали, погружая свободные от соли влажные кристаллы в чистый ксилен, который гигроскопичен, поглощает кристаллизационную воду и сам не проникает в кристалл.

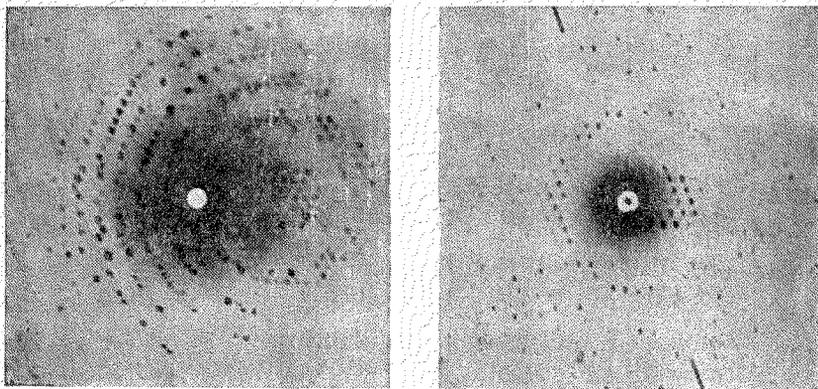


Рис. 1.

Сухие кристаллы являются значительно худшими объектами для физического исследования. В то время как влажные кристаллы позволяют провести полное оптическое исследование, измерить их двойное лучепреломление и плеохроизм, сухие кристаллы всегда имеют трещины и непрозрачны. Рентгеновское рассеяние сухих кристаллов очень слабо по интенсивности, так что получению хороших рентгенограмм мешает даже рассеяние воздуха.

Удовлетворительные результаты были получены только при съёмке в вакууме.

Для получения рентгенограммы капилляр с кристаллом монтировался на гониометрической головке и помещался в камере качания. Съёмка производилась на плоскую пластинку, находящуюся на расстоянии 50—60 мм от объекта. Съёмка на цилиндрическую камеру не имеет смысла, так как наблюдаемые интерференции расположены вблизи первичного пятна. Рентгенограммы снимались большей частью фильтрованным медным излучением: снималась серия рентгенограмм качания около основных осей кристалла, причём интервал качания был 3—5°. Типичные рентгенограммы показаны на рис. 1. Чтобы судить о максимальных отклонениях интерференционных лучей от

первичного направления, приведены данные о наименьших наблюдавшихся межплоскостных расстояниях:

Влажный гемоглобин	2,4 Å
Влажный инсулин	4,5 Å
Влажный лактоглобулин	5,5 Å
Сухой инсулин	7,5 Å
Сухой гемоглобин	13 Å

На приведённых рентгенограммах мы видим расположение пятен вдоль обычных слоевых линий. Обращает внимание своеобразное расположение рефлексов кольцами. Это расположение становится понятным из рассмотрения рис. 2. В верхней части рисунка показана серия плоскостей обратной решётки кристалла, перпендикулярных первичному лучу. Ввиду близости этих плоскостей друг к другу, а также из-за густоты узлов обратной решётки на этих плоскостях, эффективными для отражения областями в обратной решётке будут кольца (составленные из двух серпов), показанные в нижней части рисунка. Эти кольца суть сечения отражающей области, т. е. области между двумя положениями сфер Эвальда в начале и конце интервала качания, плоскостями обратной решётки, перпендикулярными к лучу. Это обстоятельство облегчает расшифровку рентгенограмм — пятна, лежащие в одной области, имеют один общий индекс интерференции. Второй индекс определяется номером слоевой линии данного пятна. Следовательно, расшифровка сводится к нахождению одного лишь третьего индекса.

Следует учесть, что расстояние между слоевыми линиями равно большей частью 0,5—1,0 м.м. Это налагает требование очень точной юстировки кристалла; необходимо также пользоваться достаточно тонкими диафрагмами.

Мы остановимся особенно подробно на последнем исследовании из серии работ, посвящённых протеинам, а именно, на изучении структуры гемоглобина¹. Объектом исследования являлся гемоглобин лошади. Кристаллы этого вещества удалось получить размерами до 1—1,5 м.м. Влажный гемоглобин даёт рефлексy вплоть до межплоскостных расстояний 2,4 ангстрема — это предельная величина для всех исследовавшихся до сих пор протеинов. Наконец, особенно существенно для точного анализа то обстоятельство, что молекула гемоглобина занимает в кристалле специальное, а не общее, положение, а именно, находится на простой двойной оси. Это следует совершенно строго из следующих соображений. Все 62 700 отражений, которые могли бы наблюдаться при указанном выше предельном значении брэгговского угла (соответствующего межплоскостному расстоянию 2,8 ангстрема — от 2,8 до 2,4 ангстрема наблюдались лишь единичные слабые рефлексy), указывают на равенство интенсивностей hkl и $\bar{h}\bar{k}l$, а также на отсутствие всех индексов hkl , для которых $h+k$

нечётно. Таким образом, исследуемые кристаллы принадлежат к моноклинной сингонии и образуют элементарную ячейку, центрированную по грани a, b . Три пространственные группы удовлетворяют этому условию: $C2$, Cm и $C2/m$. Однако установлено, что гемоглобин обладает оптической активностью; поэтому из указанных трёх групп

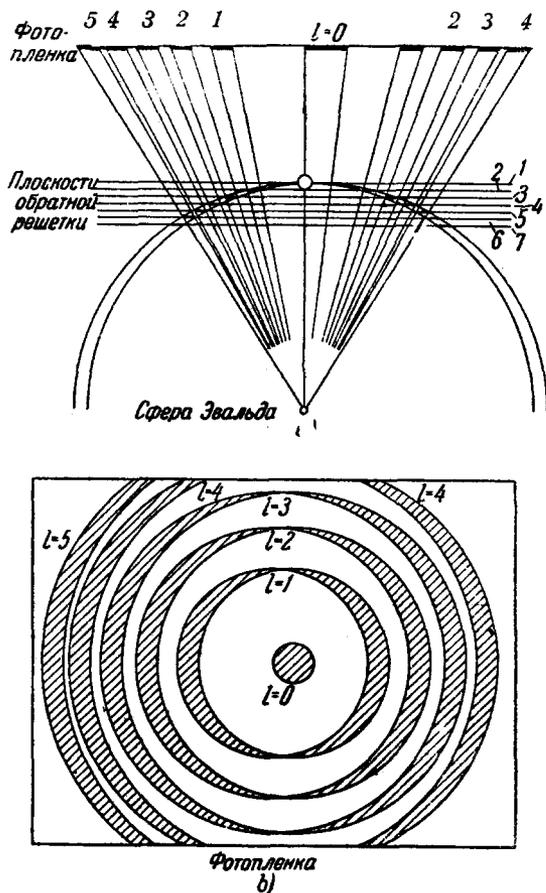


Рис. 2.

возможна лишь группа, содержащая только оси симметрии, т. е. $C2$. В этой группе имеется четыре общих положения. Химическим способом можно получить данные о молекулярном весе гемоглобина: из предположения, что в одной молекуле находятся 4 атома железа, с точностью порядка 5% получается цифра 67 000. Исходя из размера элементарной ячейки сухих кристаллов, находим, что число молекул в ячейке равно двум (следует тут же подчеркнуть, что

симметрия влажных и сухих кристаллов одна и та же). Таким образом, молекулы гемоглобина занимают в кристалле частное положение, а именно, находятся на двойной оси, идущей в приведённой в таблице ячейке вдоль оси b кристалла.

На основании данных о симметрии и размерах элементарной ячейки из чисто геометрических соображений можно сделать ряд выводов о форме и объёме молекулы. Рассматривая форму ячейки сухих кристаллов, обращаем внимание на то, что центры молекул в плоскости ab образуют почти идеальную гексагональную картину. На рис. 3 кружками трёх типов показано расположение центров молекул в трёх последующих слоях. Плоскость ab можно было бы плотно заполнить сферами диаметра b , т. е. радиуса, примерно равного 30 ангстремам. Однако в этом случае следующий слой не может подойти на расстояние более близкое, чем $d \cos 30^\circ$ к первому слою. Это даёт цифру около 50 ангстрем, в то время как наблюдаемое межплоскостное расстояние 36 ангстрем. Отсюда следует, что сферическую форму молекулам гемоглобина приписать безусловно нельзя.

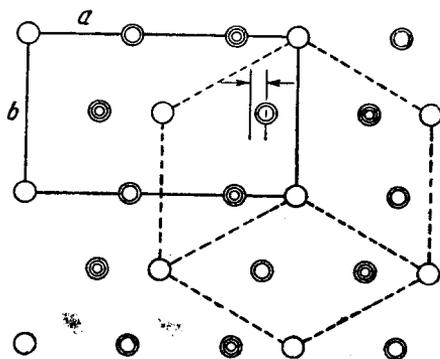


Рис. 3.

Авторы цитируемой работы приводят возражения против предположения об эллипсоидальной форме молекулы и останавливают свой выбор на цилиндрической форме. Эта часть работы является, к сожалению, самой слабой и совершенно неубедительной. Аргументируя против эллипсоидальной формы молекулы, авторы полагают, что плотность самой молекулы (т. е. отношение веса молекулы к её собственному объёму) равна плотности кристалла — совершенно неверное утверждение. Разработанным нами методом⁴ мы найдём без труда, что из геометрических соображений, основывающихся на размерах элементарной ячейки, можно аппроксимировать молекулу гемоглобина эллипсоидом, близким к эллипсоиду вращения, с размерами полуосей $30 \times 30 \times 16$ ангстрем. Объём, приходящийся на две молекулы, с нашей точки зрения, должен равняться 73% от размера элементарной ячейки, а не 91%, как совершенно ошибочно полагают авторы. Нам кажется, что эллипсоидальная модель молекулы была отвергнута авторами по той причине, что ими не рассматривалась возможность эллипсоидов, оси которых наклонены в плоскости ab . Необходимость в таком наклоне вполне очевидна на рис. 3. Мы видим, что шестиугольник центров каждого последующего слоя сдвинут по отношению к предыдущему вдоль оси a на меньшую

величину от симметричного расположения. Эта величина, указанная нами стрелками на рисунке авторов, определяет наклон оси эллипсоида от нормали к плоскости ab . Таким образом, с нашей точки зрения, противоречащей точке зрения авторов, все экспериментальные данные хорошо объясняются при аппроксимировании молекул гемоглобина трёхосными эллипсоидами размера $30 \times 30 \times 16$ ангстрем, наклонёнными своей малой осью к плоскости ab на небольшой угол. Авторы полагают, что молекулы следует аппроксимировать цилиндрами высотой 34 ангстрем и диаметром основания 56 ангстрем.

Не следует думать, что разница между этими двумя моделями столь велика. Авторы указывают, что их данные претендуют лишь на «смутное очертание» молекулы; они указывают также, что основание цилиндра несколько выпукло, что ещё более сближает обе приведённые выше модели. Следует учесть также, что линейные размеры не могут быть заданы с точностью, большей 5%. Мы хотели лишь отметить, что авторам не следовало бы противопоставлять столь резко, как они это делают в своём заключении, эллипсоидную модель (неоднократно предлагавшуюся ранее) цилиндрической.

Как бы то ни было, примерный объём и форма молекулы гемоглобина совершенно очевидны. На них основывается дальнейшее исследование, с нашей точки зрения, самая интересная часть работы, касающаяся влажных кристаллов. Экспериментальным материалом для этой части работы служат оценённые на рентгенограммах качания интенсивности 7840 отражений. На основании этих измерений для всех исследованных кристаллов можно построить ряд Паттерсона межатомных векторов. В этой работе авторы рассматривают двумерные проекции ряда на основные плоскости кристалла. В дальнейшем они намереваются произвести анализ трёхмерного ряда.

С первого взгляда может показаться неясным смысл построения ряда Паттерсона. Напомним, что ряд Паттерсона есть ряд Фурье, построенный на основании экспериментальных данных: все коэффициенты этого ряда положительны и равны структурным факторам рентгеновских отражений. Как показал Паттерсон, максимумы этого ряда указывают на существование в кристалле тех или иных межатомных векторов. Совершенно понятно, что при числе атомов в молекуле гемоглобина порядка 5000 и соответственном числе пиков в ряде Паттерсона порядка 10^8 не приходится и мечтать о расшифровке ряда, т. е. об отнесении того или иного пика к конкретному межатомному расстоянию. Более того, можно подумать, что при таком большом числе максимумов ряд будет размазан и не будет вообще обладать характерными чертами. Последнее, однако, неверно. Действительно, если имеется известная правильность в строении самой молекулы, и при наличии безусловно имеющейся правильности в расположении молекул друг по отношению к другу, должны существовать межатомные векторы, которые будут встречаться особенно часто. При этом мы вправе полагать, что в ряде обнаружат себя

межатомные векторы двух типов—внутримолекулярные (их пики должны быть вблизи начала координат ряда—маленькие расстояния) и межмолекулярные, соответствующие значительно бóльшим расстояниям. Перекрытие максимумов двух типов должно быть небольшим, так как расстояние между молекулами велико по сравнению с важными межатомными векторами.

Вполне понятно, что рассмотрение одного ряда Паттерсона не может принести какой бы то ни было пользы, и анализ интенсивностей приобретает смысл благодаря исключительному свойству кристаллов глобулярных протеинов давать серию объектов, содержащих разный процент влаги. Особенно интересны и остроумны опыты по замене кристаллизационной жидкости. Ионы диффундируют в кристалл протеина. Поэтому удалось получить объекты, в которых электронная плотность кристаллизационной жидкости колебалась от 0,33 до 0,45 электрона на кубический ангстрем. Исследование двух объектов, различающихся лишь концентрацией электронов в кристаллизационной жидкости, имеет следующий смысл. Молекула протеина может быть губчатой и впитывать в себя кристаллизационную жидкость; возможно и другое—кристаллизационная жидкость размещается в промежутках между молекулами. Если тяжёлые ионы проникнут внутрь молекул, то должна измениться вся картина рассеяния. Если, напротив, молекула не позволяет кристаллизационной жидкости проникнуть внутрь, то тяжёлые ионы только окантуют молекулу. В этом случае картина внутримолекулярного рассеяния должна остаться неизменной, а это значит, что от введения тяжёлых ионов может меняться интенсивность отражений низкого порядка. Общий характер распределения интенсивностей должен остаться неизменным. Тщательное исследование, произведённое для гемоглобина цитированными тремя авторами, доказывает этим путём, что кристаллизационная жидкость расположена между молекулами. Интересно также и то, что имеются рефлексы низкого порядка—одни мало, другие особо чувствительные к замене лёгкой кристаллизационной жидкости на тяжёлую. Скажем, интенсивность отражения 110 меняется резко, а 200 почти не меняется. Эти данные можно использовать для того, чтобы локализовать кристаллизационную жидкость в кристалле и, следовательно, уточнить контуры молекул. Эта плодотворная идея не доведена авторами до конца и лишь частично использована ими при обсуждении вопросов формы молекулы.

Прекрасным доказательством структуры влажных кристаллов как системы, состоящей из «твёрдых» молекул, окружённых кристаллизационной жидкостью, является сравнение аналогичных рядов Паттерсона для кристаллов на разной степени набухания или сокращения.

Набухание кристаллов вызывалось подвешиванием их в некоторой определённой среде (например, ненейтрализованный раствор сульфата аммония). Сокращение вызывалось искусственным высушиванием раствора, с которым кристалл находился в равновесии. Проще всего это

достигается, если в описанной выше капиллярной трубке, заклеенной пиццином, сделать маленькое отверстие.

У геомоглобина удалось наблюдать пять различных ячеек на различных стадиях сокращения кристалла. Можно считать доказанным, что процессы набухания и сокращения происходят ступенчато, так как при многократном повторении наблюдений получаются только эти пять вполне определённых ячеек. Процесс обратим, так что можно заставить появиться эти пять ячеек в порядке от большей к меньшей и наоборот. Если не рассматривать полностью высушенного кристалла, то оказывается, что все изменения сводятся к вариации моноклинного угла от $127,5^\circ$ до $84,5^\circ$. Величина периода c в пределах ошибок остаётся неизменной. Значения периодов a и b весьма строго остаются постоянными. Таким образом, изменение решётки, происходящее при набухании кристалла, сводится к возрастанию межплоскостного расстояния 001 от 42 до 55 ангстрем. Таким образом, характер распределения жидкости в кристалле становится очевидным: жидкость должна быть распределена слоем вдоль плоскости ab ; лишь совсем небольшое её количество может участвовать в образовании слоя ab . Следовательно, слой ab — это слой молекул протеина. Ещё более определённые суждения в этом же направлении могут быть вынесены из рассмотрения рядов Паттерсона, построенных для кристаллов, находящихся на разной степени набухания. Собственно говоря, только это рассмотрение и должно считаться за непосредственное доказательство существования неизменного на разных стадиях сокращения или набухания молекул протеина. В проекциях Паттерсона как для влажного, так и для сухого инсулина была найдена группа в 18 максимумов, находящихся около начала координат проекции и имеющих друг по отношению к другу одинаковое расположение в обеих проекциях. На рис. 4 показаны эти две паттерсоновские проекции для инсулина; для ясности под этими проекциями приведены их схематические представления. Разница в двух проекциях в основном сводится к ориентировке всей группы 18 максимумов — она различается на 6 градусов. Тот же эффект был показан серией рядов Паттерсона для геомоглобина (к сожалению, чертежи очень неудачны и не воспроизводимы) и для лактоглобулина. На рис. 5 показаны две проекции этого последнего вещества на двух стадиях сокращения. Во всех случаях удаётся подметить постоянство группы пиков, группирующихся около начала координат проекций (т. е. постоянство некоторой системы малых межатомных расстояний). Именно так должна вести себя проекция Паттерсона, если представлять себе процесс набухания или сокращения как процесс взаимного перемещения «твёрдых» молекул.

Как мы говорили, для геомоглобина измерения ячеек на разной степени сокращения делают вероятным расположение молекул слоями ab . Ряды Паттерсона для геомоглобина позволяют подтвердить и уточнить эту картину. При набухании и сокращении слой ab про-

теиновых молекул приближаются и удаляются друг от друга, а также сдвигаются. Наблюдая те пики, которые меняются от проекции к проекции, мы находим пики, соответствующие важным межмолекулярным расстояниям. У гемоглобина такие пики соответствуют расстоянию 18—20 ангстрем. Таким способом определяется расстояние между «поверхностями» молекул, т. е. толщина слоя жидкости (авторы толкуют этот результат не вполне так, и, как нам кажется, излишне

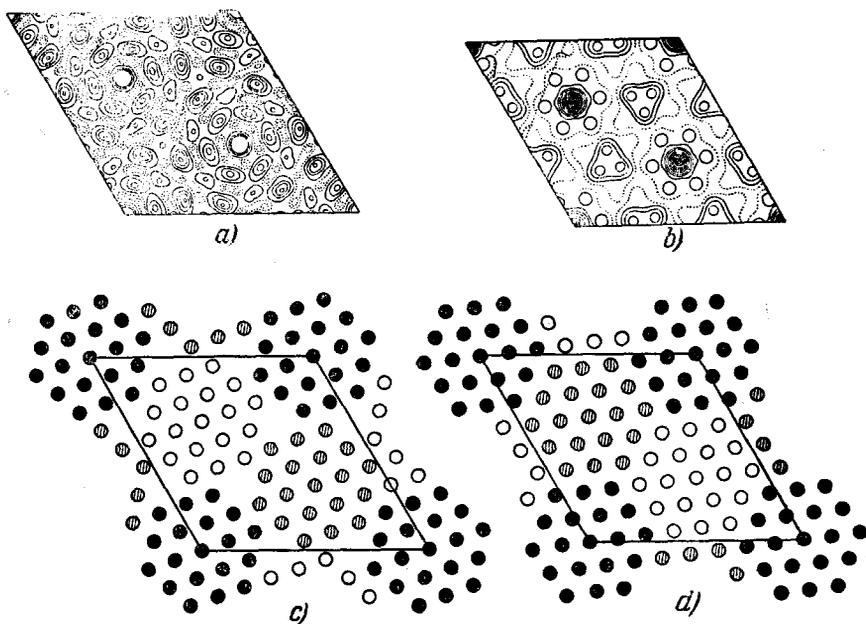


Рис. 4.

усложняют картину). На основании сказанного кристаллическую структуру гемоглобина можно иллюстрировать рис. 6.

Рентгеновское исследование позволяет решить интересный вопрос о гидратации протеинов. Известно, что концентрация подвижных ионов в кристаллизационной жидкости всегда меньше, чем в среде, с которой кристалл находится в равновесии. Таким образом, кристалл содержит избыток воды, не зависящий в широких пределах от концентрации соли. Можно сделать две гипотезы о местонахождении этой «добавочной» воды. Во-первых, можно предположить, что воду надо разделить на два сорта: «связанную», непосредственно соединяющуюся с молекулой протеина, и «свободную», которая разрешает диффузию ионов и находится в динамическом равновесии со средой. Разумеется, состав «свободной» жидкости будет такой же, как и у окружающей среды. Другое предположение будет

обратно первому: мы можем допустить, что «добавочная» вода равномерно распределяется вдоль всей кристаллизационной жидкости.

У нормального влажного кристалла расстояние между слоями равно 50,7 ангстрема. Если справедливо второе предположение, то ис-

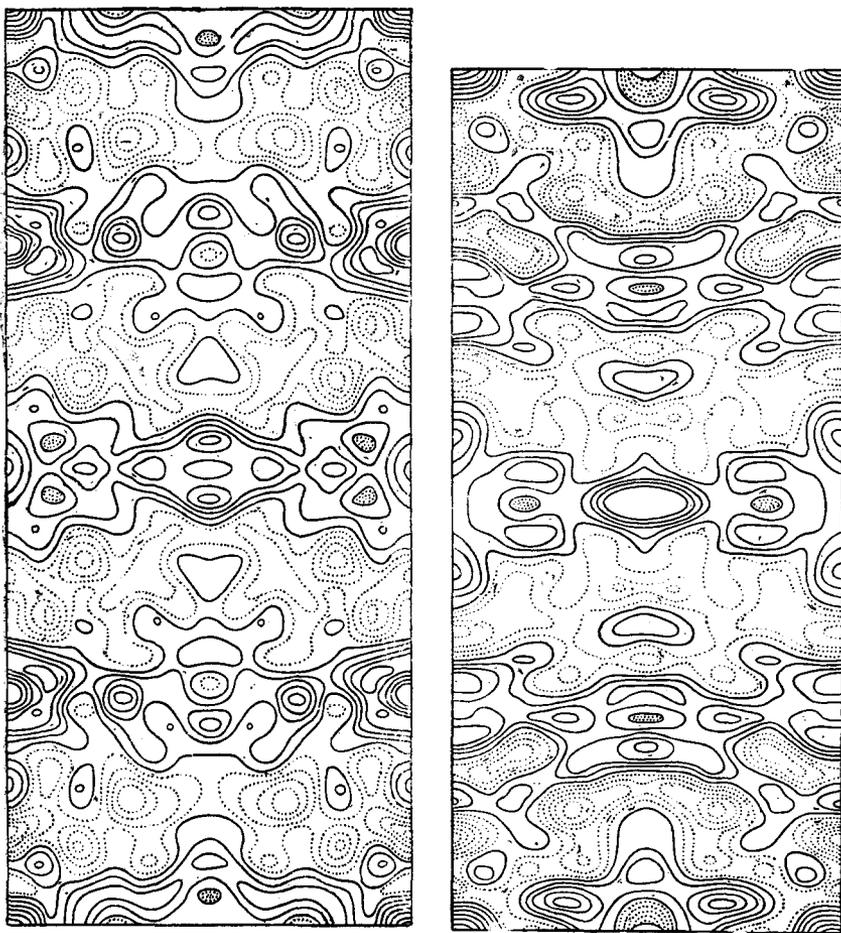


Рис. 5.

следуемый кристалл надо рассматривать как слой протеина толщиной 34 ангстрема и слой жидкости однородной концентрации толщиной 16,7 ангстрема. Если верно первое предположение, то мы имеем слой гидратированного протеина толщиной 40,1 ангстрема и слой свободной жидкости толщиной 10,6 ангстрема. Последняя цифра вы-

числена умножением 16,7 на отношение «свободной» воды ко всему её количеству. При наличии в жидкости тяжёлых ионов средняя электронная концентрация слоя кристаллизационной жидкости значительно больше этой величины для воды. Для обеих указанных моделей можно подсчитать интенсивности отражений от плоскости ab . Сравнение с опытом приводит к доказательству гидратации протеина. Каждая молекула белка гидратирована, т. е. обернута слоем воды.

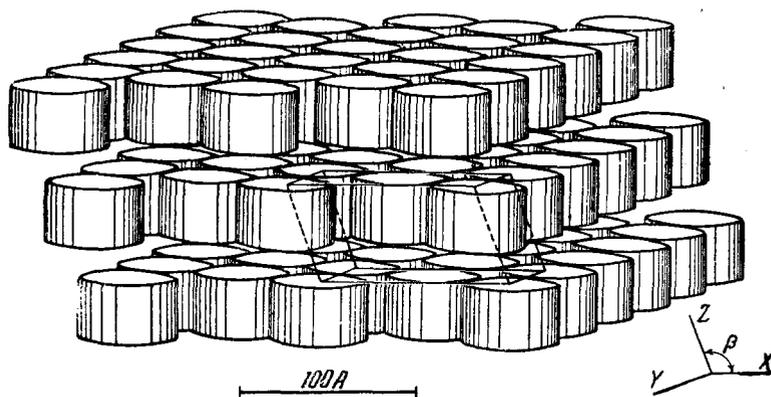


Рис. 6.

К сожалению, лишь незначительные сведения удаётся получить о строении самой молекулы протеина. Как будто бы несомненным является высокая правильность строения молекул влажных кристаллов — об этом говорит наблюдаемость интерференций вплоть до $\lambda \approx 2,5$ ангстрема, т. е. почти до межатомных расстояний. Это, правда, не вполне вяжется с наблюдаемостью рефлексов только до 10 ангстрем у сухих кристаллов. Нам кажется несколько преждевременным заключение Бернала и Фанкухена о полной правильности строения белковой молекулы.

Более детальное исследование строения молекулы проведено в отношении гемоглобина. Целый ряд косвенных соображений помог авторам установить знаки структурных амплитуд отражений от основной плоскости ab кристалла (плоскость молекулярного слоя). Таким образом, оказалось возможным построение одномерного ряда электронной плотности. Так как в ячейке один слой молекул, то полученный ряд позволяет непосредственно определить общий характер распределения электронной плотности вдоль короткой оси (той, которая равна 32—36 ангстремам) молекулы. Были найдены четыре максимума электронной плотности на расстоянии около 9 ангстрем друг от друга. Смысл этих скопления плотности остаётся неясным. Опыт не может в настоящее время проверить такие теории строения белка, как цик-

льную гипотезу Ринч. Её попытки обосновать свою теорию анализом рядов Паттерсона не имеют под собой никакой почвы.

* Оставаясь в рамках рентгеноструктурного анализа, мы можем надеяться на получение новых результатов, только применив трёхмерный синтез Паттерсона. Эта исключительно громоздкая работа, очевидно, будет скоро проведена и, надо надеяться, даст новые данные о строении глобулярных протеинов.

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. J. Boyes-Watson, E. Davidson and M. F. Perutz, Proc. Roy. Soc. A 191, 83 (1947).
 2. D. Crowfoot, Chem. Rev. 28, 215 (1941).
 3. Т. Фанкучен, Ann. Rev. Biochem. 14, 213 (1945).
 4. Китайгородский А. И., Известия Хим. Отд. АН СССР, 587, (1946).
-