УСПЕХИ ФИЗИЧЕСКИХ НАУК

ФИЗИКА НАШИХ ДНЕЙ

621.386.8+547.96

РЕНТГЕНОСТРУКТУРНЫЙ АНАЛИЗ ГЛОБУЛЯРНЫХ БЕЛКОВ

Б. К. Вайнштейн

§ 1. ПРИНЦИПЫ СТРОЕНИЯ БЕЛКОВ. КРИСТАЛЛИЧЕСКИЕ БЕЛКИ

Благодаря многолетним усилиям выдающихся исследователей в последнее время были достигнуты знаменательные успехи в решении проблемы структуры белка. Расшифровка строения некоторых белков и установление строения ДНК являются важнейшими факторами интенсивного развития молекулярной биологии. Одной из причин такого развития явилось широкое применение физических методов изучения биологических макромолекул.

Важнейшим из этих методов является рентгеноструктурный анализ, который более чем за полвека своего существования (Лауэ обнаружил дифракцию рентгеновских лучей в 1912 г.) открыл физике твердого тела, химии, минералогии, металловедению конкретный мир атомных кристаллических структур, а теперь дал столь замечательный выход в биологию.

Различные глобулярные белки осуществляют неисчислимое коли-чество реакций обмена веществ живой природы ^{1, 2}. Эти реакции, например, расщепления определенных связей либо, наоборот, соединения друг с другом некоторых молекул, переноса электронов и т. п., весьма избирательны и идут с громадными скоростями. Так, некоторые реакции ускоряются ферментами в 10⁶—10¹¹ раз. Химические и биологи-ческие методы изучения ферментативной (энзиматической) активности белков при их взаимодействии с субстратом (тем веществом, над которым данный фермент «работает») или ингибитором (веществом, которое блокирует эту активность) позволяют получать сведения о химической структуре активного центра белковой молекулы. Полное понимание механизма биологической активности невозможно без знания пространственной структуры. Это и определяет значение и место рентгеноструктурного анализа белков. Конечно, выполненные к настоящему времени определения строения нескольких белков — это не много на фоне всего неисчислимого разнообразия их. Например, число белков у человека оценивается в 105; число уже выделенных и изучаемых биохимиками ферментов составляет около 1000. Тем не менее можно сказать, что имеющиеся сейчас результаты, особенно в сочетании с биохимическими данными, представляют огромный интерес.

Белки представляют собой цепные молекулы большого молекулярного веса, построенные из аминокислотных остатков. Аминокислоты

различаются своим радикалом R. Отрыв одного из атомов H аминогруппы и OH от карбоксила (с выделением воды) дает возможность остаткам сомкнуться в полипептидную цепь



которая лежит в основе строения белков. Громадное большинство белков построено из 22 «главных» аминокислот, которые часто уподобляют «алфавиту белкового языка» (табл. I), однако известно еще более пяти-

Таблица I



десяти реже встречающихся аминокислот ³. Индивидуальность и свойства данной аминокислоты или звена полипептидной цепи определяются радикалом R. Радикалы одной группы аминокислот, например, глицина, фенилаланина и др., нейтральны; они отталкивают молекулы воды, т. е. являются гидрофобными. Радикалы других остатков имеют активные полярные или заряженные группы OH, COO⁻, NH⁺₂, способные образовывать водородные или ионные связи. К ним легко присоединяются молекулы воды. Особую роль играет возникающий при соединении двух





дисульфидный мостик которого связывает полипептидные цепи друг с другом.

Атом C_{α} аминокислот — асимметрический, следовательно, аминокислоты являются оптически активными молекулами. Белки построены из левых (L) аминокислот. Таким образом, белки, как и вообще все биологические молекулы и структуры, существуют только в одной из двух мыслимых зеркально равных форм.

Простейшие сведения о строении той или иной белковой молекулы заключены в ее валовом аминокислотном составе. Данные о таком составе — это как бы нулевое приближение в описании структуры белка.

Далее различают первичную, вторичную, третичную и четвертичную структуры белка. Первичная структура — это последовательность аминокислот в цепях и способ соединения цепей (если их несколько) или замыкания с собой одной и той же цепи дисульфидными мостиками. В развернутой химической формуле, описывающей первичную структуру, например, в формуле инсулина (4), заключена топология белковой



молекулы. Буквы уже сложены во фразу. Но этого еще далеко не достаточно для полного описания, ибо цепь, каждое ее звено и боковой радикал определенным образом расположены в трехмерном пространстве.

Первичную структуру устанавливают, как это впервые сделал Ф. Зангер и др.⁴ в 1955 г. на примере инсулина (4), производя ферментативное расщепление белка на короткие пептиды, содержащие три—пять семь остатков. В этих коротких пептидах последовательность уже можно определить химическими методами. Поскольку при разных расцеплениях цепь рвется в разных местах, комбинируя полученные «обрывки слов», можно однозначно установить всю «фразу». В настоящее время известна первичная структура около двадцати белков.

Понятия вторичной, третичной структуры уже носят геометрический характер. Важнейшую роль в понимании общих геометрических закономерностей, управляющих конформациями полипептидных цепей, сыграли работы школы Полинга ⁵⁻⁷. На основании рентгенографических определений строения некоторых аминокислот (а сейчас они изучены почти все; рис. 1) и пептидов Полинг и Корей ^{5,6} установили «стандартные» длины связей и углы, характерные для звена полипептидной цепи (рис. 2). Разнообразие конформаций цепей обеспечивается свободой поворота



Рис. 1. Синтез Фурье молекулы фенилаланина⁸. Изолинии равной электронной плотности проведены через 1 эл/Å³.

вокруг одинарных связей C_α — N и C — C_α, тогда как амидная группа всегда остается плоской. Характерными для белков (как и для биологических структур вообще) являются водородные связи. Эти связи NH ... О



Рис. 2. Строение звена полипептидной цепи ⁵.

могут возникать между различными цепями или между звеньями одной и той же цепи. Имея энергию 5— 10 ккал/моль (энергия ковалентных связей — 50—80 ккал/моль), они достаточно прочны, чтобы стабилизировать ту или иную конформацию полипептидных цепей, и достаточно слабы, чтобы допустить в некоторых условиях конформационные переходы.

Рентгенографическое изучение укладки полипептидных цепей в волокнистых белках (из них состоят волосы, кожа и т. п.), начатое еще в 30-е годы Астбери ^{9,10}, а также модельных полимеров — синтетических полипептидов, содержащих лишь один тип радикала В ^{11,12},

дало сведения о двух основных типах конформации полипептидных цепей. В одной из них, β-форме, цепочки (2) растянуты, расположены параллельно и сшиты друг с другом Н-связями. Строение другой, α-формы (рис. 3), было установлено Полингом и Кореем в 1953 г. на основании данных о стереохимии аминокислот и закономерностях Н-связей. Идеи о спиральной структуре полимеров вообще и полипептидных ценей в частности уже некоторое время бродили в умах исследователей, но их не удавалось совместить с правилами кристаллографической симметрии, согласно которым в кристаллах возможны только целочисленные винтовые оси симметрии — второго, третьего, четвертого или шестого порядков. Революционным шагом Полинга был отказ от целочисленной симметрии для удовлетворения конформационных требований. Так, в α-спирали (рис. 3, 4) на ее иять оборотов приходится 18 остатков (спираль 18/5).



Рис. 3. а-спиральная конформация полипентидной цени (правая а-спираль) и ее проекция.

период ее равен 27 Å, шаг спирали 5,2 Å, проекция остатка на ось 1,5 Å. Изученные до сих пор α -структуры — все правые. В настоящее время выяснены особенности симметрии и строения биологических цепных молекул и создана теория дифракции от таких структур ¹³⁻¹⁵.

Способ свертывания полипептидной цепи в определенную конформацию, стабилизированную водородными связями, и называют вторичной структурой. Продолжая наше сравнение с алфавитом, можно уподобить вторичную структуру способу написания: параллельными или же антипараллельными строчками, или строчкой, идущей спирально по цилиндру.

В глобулярных белках свернутая сложным образом и компактно сложенная в глобулу цепь на разных своих участках имеет различные конформации. Это уже не ровные строчки, а трехмерный кроссворд чайнворд. Трехмерная пространственная структура белковой молекулы с указанием следования цепи и положения всех радикалов и атомов это и есть третичная структура белка.

Нужно отметить, что в состав ряда глобулярных белков входят так называемые простетические группы непептидной природы, часто содержащие в своем составе атомы металлов. Для некоторых белков (и других биомолекул) различают еще так называемую четвертичную структуру. Они построены из нескольких субъединиц — протомеров, которые либо все идентичны (одного сорта), либо различны (двух или более сортов). Способ взаимной укладки протомеров в молекулу и называют четвертичной структурой.



Рис. 4. Проекция фурье-потенциала α-спирали (синтетический полинептид поли-γ-метил-*L*-глютамат, электронографические данные ¹¹).

Кроме рентгеновского анализа, ценные сведения о строении глобулярных белковых молекул дают и некоторые другие методы. Это ультрацентрифугирование (мол. вес), рассеяние рентгеновских лучей



Рис. 5. Кристаллы миоглобина кашалота (типа А (×15)).

мол. вес), рассеяние рентгеновских лучен под малыми углами (форма, мол. вес), оптические измерения и, в частности, определение дисперсии оптического вращения (процент спирализации цепей), электронная микроскопия и др.

Если глобулярный белок хорошо очищен, то его, как правило, можно закристаллизовать ¹⁶ (рис. 5). В зависимости от растворителя, его *pH* и т. п. некоторые белки могут образовывать несколько полиморфных кристаллических модификаций. Кристаллы содержат в промежутках между молекулами маточную жидкость («влажные кристаллы»), и стабильны в равновесии с этой жидкостью или ее пара́ми. Рентгенографически уста-

новлено, что часть молекул воды прочно связана с поверхностью белковой молекулы, образуя своего рода «рубашку» (рис. 6), другая свободная часть маточной жидкости — разупорядочена ¹⁷. Можно высушивать кристаллы, при этом значительная часть свободной кристаллизационной воды уходит, объем элементарной ячейки уменьшается ¹⁸, а кристаллы разупорядочиваются.

Первые рентгенограммы монокристаллов белков (пепсина и инсулина) были получены в 1934 г. Дж. Берналом и его ныне знаменитой ученицей Д. Кроуфут-Хочкин (нобелевский лауреат 1964 г.; премия присуждена за рентгеноанализ витамина B₁₂^{19, 20}). Сам факт образования белковых кристаллов, дающих тысячи отражений на рентгенограммах (рис. 7), свидетельствует о тождестве всех гигантских молекул данного белка и наличии у них фиксированного внутреннего строения.

Иногда высказывается сомнение, сохраняют ли молекулы белков в кристалле ту структуру, которая присуща им в растворе, когда они биологически активны. Не разбирая

оиодогически активны. Пе разбирая всех доказательств (из которых простейшее то, что и во влажном кристалле эти молекулы фактически окружены раствором), укажем, что это сомнение необоснованно.

Количественные трудности рентгеноанализа белков — а они, сразу оговоримся, представляют собой незначительную долю всего комплекса трудноэтой задачи — могут стей решения иллюстрировать округленные цифры, приведенные в табл. II. Информация, рентгеноструктурном заключенная в эксперименте, - это набор интенсивностей дифрагированных кристаллов пучков. Их количество пропорционально объему ячейки, но уменьша-



Рис. 6. Гидратация молекулы гемоглобина ⁴⁰.

ется при несовершенстве структуры. С «обычными» кристаллами возможен прецизионный структурный анализ с определением межатомных

Таблица II

	Периоды ячеек, А	Объем ячеек, А ³	Число атомов в ячейке	Число отражений	d _{min} , Å		
Обычные кристаллы Сложные органические	5—15	103	до 10 ²	1000	0,5—1 Å		
соединения — витами- ны, гормоны и др Глобулярные белки Вирусы	10-25 30-100 200-2000	$104 \\ 105 \\ 106 - 109$	до 10 ³ до 10 4 до 107	до 3000 1000—30 000 до тысяч	1,0 1,2—10 Å 10 Å и бо- лее		

расстояний с точностью до 0,005 Å, параметров анизотропных тепловых колебаний атомов и т. п. Если белковый кристалл дает большое дифракционное поле с десятками тысяч отражений, то для него также в принципе возможно доведение исследования до определения положений атомов.

Для проведения рентгеноструктурного исследования монокристалл белка длиной до одного мм и сечением в несколько десятых мм заключается в тонкостенный капилляр с капелькой маточной жидкости. Специальные рентгеновские камеры (прецессионные или рентгенгониометрические) дают возможность регистрировать фотографически плоские сетки обратной решетки (см. рис. 7); интенсивности пятен затем фотометрируются. В настоящее время все большее распространение получают автоматические рентгеновские дифрактометры, сопряженные со счетно-решающими устройствами. Кристаллы белков чувствительны к радиационному воздействию рентгеновских лучей, поэтому после определенной дозы облучения их заменяют.

Как мы увидим ниже, в процессе рентгеноанализа приходится исследовать кристаллы не одного данного белка, а десятки модифицированных кристаллов. Таким образом, только объем собственно рентгеновского

Рис. 7. Прецессионная рентгенограмма кристалла миоглобина (одно из сечений обратной решетки).

эксперимента становится громадным. Например, при изучении миоглобина на совокупности рентгенограмм этого белка и его производных было измерено четверть миллиона отражений.

Однако основная, принципиальная трудность задачи заключается в ином — в проблеме вывода структуры из экспериментальных данных. Чтобы разобраться в сложности и характере этой проблемы, нам необходимо совершить краткий экскурс в теорию рентгеноструктурного анализа вообще и кристаллических белков в особенности.

§ 2. ПРИНЦИПЫ РЕНТГЕНОСТРУКТУРНОГО АНАЛИЗА. МЕТОДИКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ СТРУКТУРЫ КРИСТАЛЛИЧЕСКИХ БЕЛКОВ

Когерентное рассеяние рентгеновских лучей происходит на электронах, т. е. определяется функцией электронной плотности ϱ (**r**) — средним во времени распределением электронов данного объекта. Функция ϱ (**r**) для кристалла трехмерно периодична с периодами *a*, *b*, *c* элементарной ячейки. Амплитуда рассеяния равна

$$F_{hhl} = \frac{1}{\Omega} \int_{\Omega} \varrho(x, y, z) \exp\left[2\pi i \left(\frac{hx}{a} + \frac{ky}{b} + \frac{lz}{c}\right)\right] dx \, dy \, dz; \tag{5}$$

здесь Ω — объем ячейки, h, k, l — миллеровские индексы отражающих плоскостей, определяющие значение соответствующего вектора обратной решетки $\mathbf{H}_{hkl} = h\mathbf{a}^* + k\mathbf{b}^* + l\mathbf{c}^*$, где \mathbf{a}^* , \mathbf{b}^* , \mathbf{c}^* — периоды обратной решетки. Брэгговские углы отражений 20 определяются соотношением

$$\frac{\sin\vartheta}{\lambda} = \frac{|\mathbf{H}_{hkl}|}{2} = \frac{1}{2d_{hkl}},\tag{6}$$

где d_{hkl} — межплоскостное расстояние. Интенсивности отражений пропорциональны квадратам модулей амплитуд: $I_{hkl} \sim |F_{hkl}|^2$.

Так же как и в оптике, рентгеновский дифракционный эксперимент осуществляет разложение Фурье функцип $\varrho(x, y, z)$, рассеивающей способности объекта, и амплитуды F_{hkl} (5) — не что иное, как коэффициенты этого разложения. Согласно теории оптического микроскопа Аббе, сведе́ние дифрагированных волн с помощью линз в изображение объектива уже эквивалентно синтезу Фурье. Поскольку линз для рентгеновских лучей нет, этот второй этап — образование изображения осуществляется вычислительным путем. Таким образом, трехмерный ряд

$$\varrho(x, y, z) = \frac{1}{\Omega} \sum_{h} \sum_{k} \sum_{l} F_{hkl} \exp\left[-2\pi i \left(\frac{hx}{a} + \frac{ky}{b} + \frac{lz}{c}\right)\right]$$
(7)

дает интересующую нас функцию $\varrho(x, y, z)^{21-24}$. Коэффициенты F_{hhl} в общем случае нецентросимметричных структур — комплексные величины:

$$F_{hkl} = |F_{hkl}| e^{i\alpha}. \tag{8}$$

Если структура центросимметрична ($\varrho(\mathbf{r}) = \varrho(-\mathbf{r})$), то фаза $\alpha = 0$ или л и $F = \pm |F|$ — действительны. Функция электронной плотности может быть представлена как сумма электронных плотностей ϱ_j атомов, входящих в ячейку:

$$\varrho(\mathbf{r}) = \sum_{j} \varrho_{j} (\mathbf{r} - \mathbf{r}_{j}). \tag{9}$$

Рассмотрим характер восстановленной по (7) функции $\varrho(\mathbf{r})$ в зависимости от полноты набора F_{hkl} . Допустим, что в ряд включены все отражения, заключенные внутри сферы радиуса $|\mathbf{H}_{\max}| = d_{\min}^{-1}$, т. е. согласно (6) с брэгговскими углами, не превышающими некоторый угол $2\vartheta_{\max}$. В оптике это соответствовало бы ограничению апертурного угла микроскопа, что ведет к уменьшению разрешения изображения. Аналогичный эффект уменьшения разрешения, которое удобно характеризовать величиной d_{\min} , имеет место и в рядах Фурье $^{21-23}$. На рис. 8 показан характер изменения синтеза Фурье в зависимости от числа включенных в ряд членов F_{hkl} с некоторым предельным $|H_{\max}| = d_{\min}^{-1}$. Мы видим, что для разрешения атомов необходимо иметь $d_{\min} \simeq 1,5$ Å; $d_{\min} \simeq 6$ Å дает грубые сведения о сгущениях электронной плотности, без разрешения индивидуальных атомов 25 .

При анализе белков вопрос о разрешении важен с двух точек зрения. Во-первых, кристаллы некоторых белков (и все белки в сухой форме) вообще дают отражения только с большими d (например, с $d_{\min} \simeq 10$ Å), и исследование таких белков не представляет интереса. Причиной быстрого спада интенсивностей является разупорядоченность структуры (повороты и смещения молекул и другие дефекты упаковки, а также возможные нарушения строения самих молекул). Вклад в уменьшение интенсивностя с увеличением $\sin \theta/\lambda$ вносит и тепловое движение. Влияние всех этих факторов вместе на интенсивность в первом приближении можно описать дебаевским температурным множителем

$$I_{hhl} = I_{hhl(0)} \exp\left[-16\pi^2 \overline{u^2} \left(\frac{\sin\vartheta}{\lambda}\right)^2\right], \qquad (10)$$

где $\overline{u^2}$ — среднеквадратичное смещение атомов из положения равновесия. Для обычных органических кристаллов $\sqrt{\overline{u^2}} \simeq 0.2$ Å, для «хороших» белков $\sqrt{\overline{u^2}} \simeq 0.5$ Å, для разупорядоченных белков и вирусов $\sqrt{\overline{u^2}} > 3$ Å, что сравнимо с межатомными расстояниями. Такая величина в экспоненте быстро уменьшает интенсивности дифракционных пучков, d_{\min} растет, и падает разрешающая сила ряда Фурье. Действительно, поскольку интенсивности I_{hkl} рассеяния от кристалла отражают среднюю по времени и по всем его ячейкам электронную плотность и если эта электронная плотность «размазана» беспорядком, то ряд Фурье может



Рис. 8. Картина синтеза электронной плотности молекулы дикетопиперазина при различных разрешениях (в Å).

восстановить лишь столь же размазанную картину. Однако в целом ряде кристаллических белков d_{\min} является достаточно малым (1,2—2 Å), чтобы в принципе можно было провести полный структурный анализ.

Другой аспект вопроса о разрешении — методический. Число отражений пропорционально $|H_{\max}|^3 = (d_{\min}^{-1})^3$. Трудно сразу промерить все имеющиеся десятки тысяч отражений от кристаллического белка и сразу же все их пустить в работу. Целесообразнее идти шаг за шагом, исследуя белок сначала с низким разрешением (скажем, 5 Å, для чего нужно всего около тысячи отражений), и, выявив основные черты его строения, переходить к более высокому разрешению.

Включая в ряд ограниченное число отражений, их интенсивности корректируют искусственным температурным множителем типа (10), плавно сводя их к минимуму при d_{\min} , что исключает появление в картине синтеза Фурье фальшивых деталей из-за резкого обрыва ряда.

Основная трудность рентгеноструктурного анализа вообще, и белков в особенности, — это отсутствие прямых указаний о фазах α (8) коэффициентов Фурье, так как эксперимент дает только $|F_{hhl}|^{21-24}$.

Фазы легко рассчитать, если структура известна. Амплитуды рассеяния отдельными атомами (атомные факторы) f_j табулированы. Используя (5) и (9), получим

$$F_{hhl} = \sum_{j=0}^{n} f_j \exp\left[2\pi i \left(\frac{hx_j}{a} + \frac{ky_j}{b} + \frac{lz_j}{c}\right)\right],\tag{11}$$

где x_j , y_j , z_j — координаты атомов в ячейке. Если для некоторой пробной модели рассчитанные значения $|F_{\rm BMY}|$ хорошо согласуются с наблюдаемыми $|F_{\rm 2KCH}|$, то, значит, и рассчитанные фазы (или знаки — для центросимметричных структур) близки к истинным. Приписывая эти фазы наблюденным $|F_{\rm 2KCH}|$ и строя ряд (9), мы получаем картину структуры. Такого рода подход, основанный на сближении $|F_{\rm 2KCH}|$ и $|F_{\rm BMY}|$, возможен при поиске и особенно при уточнении структуры $^{21-23, 26-29}$, но неприменим к белкам.

Практически неприменимыми оказываются и так называемые «прямые методы» определения фаз ³⁰⁻³³ на основе данных о модулях |F|. Они работают лишь при числе *n* атомов в ячейке до 100—200, тогда как для белков $n \simeq 10^3 - 10^4$.

Другая группа методов основана на совместном рентгеноструктурном анализе близких по строению кристаллов (метод изоморфных структур) или на введении в структуру тяжелых, сильно рассеивающих атомов. В последнем случае величины f_j одного такого или нескольких атомов дают основной вклад в значение F_{hkl} (11) и знание их положения в первом приближении позволяет определить фазы. Эти подходы особенно эффективны в сочетании с построением так называемой функции Паттерсона³⁴.

Образуем самосвертку (квадратичную свертку) электронной плотности:

$$Q(\mathbf{r}) = \stackrel{2}{\widetilde{\varrho}}(\mathbf{r}) = \int \varrho(\mathbf{r}') \varrho(\mathbf{r}' + \mathbf{r}) dV_{\mathbf{r}'}.$$
 (12)

Ее коэффициентами Фурье являются произведения $F_{hkl}F_{hkl}^* = |F_{hkl}|^2$ — экспериментально наблюдаемые положительные величины. Ряд Фурье

по ним и есть функция Паттерсона — самосвертка $\widetilde{\varrho}$:

$$Q(\mathbf{r}) = \frac{2}{\Omega} \sum_{h=0}^{+\infty} \sum_{k=-\infty}^{+\infty} \sum_{l=-\infty}^{+\infty} |F_{hkl}|^2 \cos\left[2\pi\left(\frac{hx}{a} + \frac{ky}{b} + \frac{lz}{c}\right)\right].$$
 (13)

 $Q(\mathbf{r})$ принимает большие значения, когда вектор **r** в (12) соответствует таким расстояниям между точками **r**' и **r**' + **r** исходной функции $\varrho(\mathbf{r}')$, в каждой из которых она имеет большие значения. Но такие **r** — это расстояния между центрами атомов. Используя представление (9), мы можем выразить свертку (12) как сумму сверток электронных плотностей пар атомов $\varrho_j \varrho_k = q_{jk} (\mathbf{r} - \mathbf{r}_{jk})$, где $\mathbf{r}_{jk} = \mathbf{r}_j - \mathbf{r}_k$ — межатомное расстояние:

$$Q(\mathbf{r}) = \sum_{j=h}^{n} q_{jj} (\mathbf{r} - 0) + \sum_{j\neq h}^{n(n-1)} q_{jk} (\mathbf{r} - \mathbf{r}_{jk}).$$
(14)

Таким образом, Q (**r**) содержит пики q_{jk} ; вектор \mathbf{r}_{jk} , соединяющий каждую пару атомов в структуре, представлен в Q (**r**) также ориентированным вектором, отложенным от начала координат до пика q_{jk} (рис. 9).

При *n* атомах в структуре $Q(\mathbf{r})$ содержит n^2 пиков, *n* из них совпадают в начале координат¹⁴.

9 УФН, т. 88, вып. 3

Хотя функция $Q(\mathbf{r})$ не дает картины расположения атомов, получаемые с ее помощью сведения весьма ценны — наблюдаемые межатомные расстояния r_{jk} определяют таковые в структуре. В принципе из $Q(\mathbf{r})$ можно однозначно вывести структуру ³⁵⁻³⁹. Однако и этот подход неприменим к белкам. Дело в том, что объем ячейки пропорционален n, а число пиков функции Паттерсона n(n-1) и они многократно перекрываются друг с другом. В белках n > 1000, и $n(n-1) > 10^6-10^7$ перекрывающихся максимумов функции Паттерсона могут отражать

 $\begin{array}{c} & & & & & & & & \\ & & & & & & & & \\ & & & & & & \\ & & & & & \\ &$

Рис. 9. Точечная структура из четырех атомов (а) и ее функция межатомных расстояний (б). Атомы 1 и 2 — тяжелые.

лишь общий характер распределения межатомных расстояний.

Если в структуре, состоящей из легких атомов, есть тяжелые атомы (1 и 2 на рис. 9), то, поскольку $q_{jh} \sim Z_j Z_h$, соответствующие пики будут наиболее сильными. Однако в белках и эти пики нельзя непосредственно различить на фоне еще более сильных пиков за счет перекрывания. Тем не менее эта трудность преодолима, если иметь две изоморфные структуры, т. е. структуры с одинаковыми ячейками, все атомы которых тождественно расположены и все, кроме одного или нескольких (тяжелых), тождественны. Тогда, оперируя с разностями функции Паттерсона (13), можно элиминировать влияние «общей части» структуры и найти положение тяжелого атома.

Но как получить изоморфные кристаллы столь сложных, формирующихся только в процессе биосинтеза молекул, как белки? Сначала были сделаны попытки использовать в качестве изоморфных сухие и влажные кристаллы данного белка. Поскольку при умеренном высушивании структура молекул не меняется, различие в рассеивающей способности возникает за счет уменьшения количества маточной жидкости. Рентгенограммы показывают заметное изменение интенсивностей отражений низ-

ких порядков ^{40, 41}. В разложении Фурье (7) им соответствуют длинноволновые гармоники, определяющие самые грубые особенности структуры. Поэтому анализ изменения интенсивностей при высушивании не мог дать сведения о тонком строении молекул, однако он оказывается полезным для выводов об их внешней форме и положении в ячейке.

М. Перутц первый обратил внимание на то, что если нельзя заместить какие-либо атомы белка на более тяжелые, то, может быть, удастся «прилепить» к белковой молекуле такие атомы в составе относительно небольших органических молекул или неорганических ионов ⁴². Л. Брэгг назвал эту идею Перутца золотой жилой, но, как позже заметил Перутц, жила оказалась залегающей так глубоко, что первые результаты ее разработки пришли через многие годы. Сотни опытов с различными веществами, имеющими в своем составе тяжелые атомы, выяснили следующее. Поверхность белковых молекул, богатая активными группами, иногда адсорбирует такие вещества. Однако при этом часто происходит нарушение изоморфизма — ячейка и укладка молекул меняются, и такие замещенные кристаллы для целей рентгеноструктурного анализа непригодны. Группа видного исследователя Д. Харкера (США), работающая над структурой рибонуклеазы, получила в пятидесятых годах десятки производных с тяжелыми атомами, но все они оказались неизоморфными ⁴³. Более повезло англичанам — Дж. Кендрью, работавшему над миоглобином, и самому М. Перутцу, изучавшему гемоглобин (причем они перепробовали кристаллы этих белков, полученные от животных различных видов).

В настоящее время состояние этого вопроса следующее. Существует список примерно сотни веществ, которые перспективны как возможные изоморфные добавки, например, $HgCl_2$, $AuCl_4^{++}$, PtJ_4^{++} , $PdCl_6^{++}$, $UO_2(OH)_n$, $SrCl_3$, $Pt(NH_2CH_2COOH)_2$, $Pb(CH_3COO)_2$, $Tl_6Cl_{12}Cl_2$, ClHg SO₃H, $UO_2P_2O_7N$, $AgNO_3$, ClCH(HgCl)COOH и т. д.

Мы видим, что это — самые разнообразные соединения, не имеющие каких-либо специальных признаков, позволяющих выбирать их систематически (хотя попытки сознательного подбора непрерывно делаются). Кроме отдельных случаев (например, ковалентное взаимодействие некоторых ртутьсодержащих молекул с SH-группами), нельзя предсказать, прореагирует ли данная добавка с данным белком, к каким группам в молекуле белка она может присоединиться, и если присоединится, то останется ли структура изоморфна исходной? Природа сил связи введенных группировок с поверхностью белка не ясна; по-видимому, большую роль играет электростатическое взаимодействие.

Имеются два пути введения добавок с тяжелыми атомами (T) в белковые кристаллы (Б). Первый — выращивание белковых кристаллов из раствора, содержащего (T), второй — помещение готового кристалла чистого белка в такой раствор. В последнем случае молекулы Т диффундируют внутрь кристалла и занимают специфичные для них позиции на белковых молекулах. Иногда полезным оказывается введение двух добавок одновременно.

Оценим теперь влияние тяжелого атома на интенсивности дифрагированных пучков ⁴⁴. На первый взгляд кажется, что это влияние должно быть ничтожным — ведь белковая молекула содержит около 10⁵ электронов, рассеивающих рентгеновские лучи, а введенный атом Т — всего 80— 90 электронов. Однако это не так.

90 электронов. Однако это не так. По теореме о полноте рядов Фурье интенсивности $I_{hkl} = |F_{hkl}|^2$ связаны с квадратом значений электронной плотности ячейки ⁴⁵, и поэтому с учетом (11) можно написать

$$\sum_{h, h, l=-\infty}^{+\infty} I_{hhl} = \Omega \int_{\Omega} \varrho^2(\mathbf{r}) \, dv_r = \Omega \sum_j \int \varrho_j^2 \, dv_r.$$
(15)

Мы видим, что атомы дают вклад в интенсивность, пропорциональный квадрату их электронной плотности, т. е. в среднем

$$\overline{I} \sim \sum_{j} Z_{j}^{2}, \tag{16}$$

где Z_j — атомные номера. Тогда для белка $\overline{I}_{\rm E} \sim n Z_{\rm E}^2$, где n — число атомов в молекуле, а для белка с введенным тяжелым атомом $\overline{I}_{\rm E, T} \sim n Z_{\rm E}^2 + Z_{\rm T}^2$.

Обозначая $\Delta I = \overline{I}_{\rm E, T} - \overline{I}_{\rm E}$, найдем, что

$$\frac{\sqrt{(\Delta I)^2}}{\overline{I}_{\rm B}} \cong \sqrt{\frac{2}{n}} \frac{Z_{\rm T}}{Z_{\rm B}} \,. \tag{17}$$

Белки состоят из атомов С, N, O, т. е. $Z_{\rm E} \simeq 7$ (атомами Н можно пренебречь), $Z_{\rm T} \simeq 80$. Тогда, например, для миоглобина с $n \simeq 1200$ формула (17) дает относительное среднеквадратичное отклонение около 45%...

9*:

Все дело в том, что легкие атомы, распределенные по всему объему ячейки, рассеивают не в фазе, а электроны тяжелого атома сконцентрированы вместе и дают постоянный (по фазе) вклад в рассеяние. Разумеется, не все интенсивности меняются, имеет место статистика. Вклад тяжелых атомов в интенсивность уменьшается при неполной заселенности ими своей позиции, при нестрогом выполнении условия изоморфизма⁴⁴.

Первой ступенью в определении структуры белка является определение положения тяжелого атома Т в белке с добавкой — Б, Т^{46-49, 93}. Как мы уже знаем, построение функции Паттерсона по $|F_{\rm E, T}|^2$ не выявит положения Т. Однако, измеряя интенсивности от чистого белка $|F_{\rm E}|^2$, можно комбинировать эти величины. Рассмотрим, что даст синтез Паттерсона с коэффициентами ($|F_{\rm E, T}|^2 - |F_{\rm E}|^2$). Согласно (13) это будет разность $Q_{\rm E, T} - Q_{\rm E}$, а эти функции по (14) равны

$$Q_{\rm B} = \sum_{j,j'} q_{jj'} \left(\mathbf{r} - \mathbf{r}_{jj'} \right), \tag{18}$$

$$Q_{\mathbf{B},\mathbf{T}} = \sum_{j,j'} q_{jj'}(\mathbf{r} - \mathbf{r}_{jj'}) + \sum_{\mathbf{T},\mathbf{T}'} q_{\mathbf{T},\mathbf{T}'}(\mathbf{r} - \mathbf{r}_{\mathbf{T},\mathbf{T}'}) + \sum_{j,\mathbf{T}} q_{j,\mathbf{T}}(\mathbf{r} - \mathbf{r}_{j,\mathbf{T}}).$$
(19)

Хотя интересующая нас разность содержит не только пики взаимодействия $q_{T, T'}$ тяжелых атомов, но и пики $q_{j, T}$ взаимодействия тяжелых атомов с *n* атомами белка (*n* велико), которые дают нежелательный фон,



Рис. 10. Амплитуды рассеяния белком $F_{\rm B}$, тяжелым атомом $f_{\rm T}$ и суммарная амплитуда $F_{\rm B, T}$.

а) Центросимметричный случай (фазы а равны 0 или л). б) Общий случай фазовой диаграммы для белка с тяжелым атомом. такие синтезы все же позволяют определять положения тяжелых атомов.

Другая возможность — построение функции Паттерсона по коэффициентам $|\Delta F|^2 = ||F_{\rm B,T}| - |F_{\rm B}||^2$. Рассмотрим сначала случай центросимметричной проекции кристалла белка (например, вдоль оси 2). В этом случае $F_{\rm B,T}$ и $F_{\rm E}$ имеют фазу $\alpha = 0$ или π , а так как $f_{\rm T}$ мало (рис. 10, *a*), фазы их, как правило, равны, т. е. $|\Delta F| = |F_{\rm B,T} - F_{\rm B}| = |f_{\rm T}|$, где $f_{\rm T}$ — амплитуда рассеяния атомами Т. Следовательно, синтез Паттерсона по $|\Delta F|^2$ в этом случае есть не что иное, как

$$Q_{\mathrm{T}} = \widetilde{\widetilde{\varrho}}_{\mathrm{T}} = \sum_{\mathrm{T},\mathrm{T}'} q_{\mathrm{T},\mathrm{T}'} \qquad (20)$$

- интересующая нас функция, из которой легко находятся координаты тяжелых атомов.

Однако в общем нецентросимметричном случае величина $|\Delta F|^2$ не может быть интерпретирована так про-

сто (рис. 10, б). Можно показать, что синтез Паттерсона, построенный по таким $|\Delta F|^2$, содержит систематические пики $q_{T,T'}$ (20), хотя он также имеет некоторый фон из $q_{j,j'}$ и $q_{j,T}$ (рис. 11).

Существенно, чтобы положения тяжелых атомов T_1 , T_2 , найденные в разных производных $БT_1$, $5T_2$, ..., были отнесены к одному и тому же началу координат. Для этого используют так называемые корреляционные функции межатомных расстояний ⁵⁰⁻⁵².

После того как положения тяжелых атомов найдены, становится известен вклад $f_{\rm T}$ в амплитуду рассеяния белком с тяжелым атомом $F_{\rm E, T}$:

$$F_{\mathrm{E, T}} = F_{\mathrm{E}} + f_{\mathrm{T}},\tag{21}$$

где $F_{\rm E, T}$ и $F_{\rm E}$ определяются по (11). На комплексной плоскости (21) изображено схемой рис. 10, б. Из опыта нам известны модули $|F_{\rm E}|$ и $|F_{\rm E, T}|$. Задачей является найти фазы α_{hkl} отражений $|F_{\rm E, hkl}|$



Рис. 11. Разностная функция Паттерсона, построенная по коэффициентам $||F|_{B, T} - |F_{B}||^2$ для миоглобина.

Начало координат — в центре. Вектор до пика TT' определяет расстояние T — T' (T = HgJ4)



Рис. 12. а) Схема нахождения двух возможных значений фаз $\alpha_{\rm E}$ из известных значений $f_{\rm T}$, $|F_{\rm E},{}_{\rm T}|$, $|F_{\rm E}|$. б) Однозначное определение фазы при использовании двух производных с тяжелыми атомами.

Кроме указанных на рисунке (a) величин, известны еще f_{T_2} и f_{ET_2} .

от белка. Пересечение окружностей с радиусами $|F_{\rm B}|$ и $|F_{\rm B, T}|$, проведенных из точек 0 и — $f_{\rm T}$, как это сделано на рис. 12, a, дает два возможных значения, α и α' , и, следовательно, задачи еще не решает. Однако если иметь вторую изоморфную производную, из величин

$$f_{T_1}, |F_{B, T_1}|, f_{T_2}, |F_{B, T_2}|, |F_B|$$
 (22)

согласно той же процедуре фаза с определяется однозначно 53 (рис. 12, б).

Величины $f_{T,i}$ невелики; в определении их и всех других величин, входящих в (22), имеются ошибки. Поэтому для определения фаз лучше иметь несколько, а не две производные (рис. 13). Однако такая процедура графического определения фазового угла «на глаз» произвольна.

Выбор фазового угла можно произвести более строго ^{54, 55}. Из ошибок в определении величин (22) для всех имеющихся производных можно рассчитать вероятность $p(\alpha, |F_{\rm E}|)$ того, что данная фаза α и данный модуль $|F_{\rm E}|$ правильны, и построить на комплексной плоскости соответствующую диаграмму (рис. 14) (это распределение может иметь и два максимума).

Ошибки в определении $|F_{\rm B}|$ и α при построении синтеза Фурье (7) дают ошибки $\Delta \varrho$ распределения электронной плотности. Среднеквадратичную ошибку $\overline{\Delta \varrho}^2$ можно найти согласно (15); она равна

$$\overline{\Delta \varrho^2} = \frac{1}{\Omega} \sum_{h, k, l} (\Delta F_{hkl})^2, \qquad (23)$$

где ΔF_{hkl} — ошибка определения экспериментальных значений $F_{\rm E}$. Синтез Фурье будет «наилучшим», если $\overline{\Delta \varrho}^2$ минимально. Это требование удовлетворяется при следующем условии ⁵⁴. В синтез Фурье следует



Рис. 13. Пример определения фазы а_В для одного отражения миоглобина. Использовано пять производных; окружность, соответствующая | F_B | (белку) — жирная.

ввести не наиболее вероятные | F | и а, найденные из наиболее высокого максимума распределения $p(\alpha, |F|)$, как кажется на первый взгляд, а величины $r \mid F \mid$ и α_r , которые являются полярными координатами (центра тяжести) распределения вероятности (см. рис. 14). Если распределение имеет один максимум, то практически это равнозначно, если же максимума два и они отдалены друг от друга, то данная амплитуда несет мало полноценной информации и ее вклад в ряд Фурье соответственно уменьшается пропорционально величине r. Процедура нахождения α_r и rпоручается машине (на основе такого подхода была показана

возможность поиска белковых структур по одному изоморфному замещению ⁵⁶).

Таким образом, метод введения тяжелых атомов и определения фаз но изоморфным сериям является на сегодня основной, но, к сожалению, очень узкой дверью в мир белковых структур. Имеются еще две «форточки», на которых также следует остановиться.

При рассеянии рентгеновских лучей с длиной волны, близкой к краю поглощения данного атома, имеет место явление аномальной дисперсии. К обычной, действительной величине атомной амплитуды f_0 в этом случае добавляются также действительная часть $\Delta f'$ и мнимая $i\Delta f''$:

$$f = f_0 + \Delta f' + i\Delta f'' = f' + if''. \tag{24}$$

При выборе подходящей длины волны величина f" для тяжелых атомов, дающих основной вклад в аномальное рассеяние, может составить 15% f₀.

Заметим прежде всего, что в случае обычного рассеяния, согласно (5), (11),

$$F_{\rm H} = F_{-{\rm H}}^*, \quad |F_{\rm H}| = |F_{-{\rm H}}|, \quad \alpha_{\rm H} = -\alpha_{-{\rm H}},$$

т. е. центросимметричные в обратном пространстве амплитуды *hkl* и *hkl* являются комплексно сопряженными, а их модули одинаковы и экспериментально они неразличимы (закон Фриделя). Однако закон Фриделя не выполняется в случае аномального рассеяния ^{57, 58}. Рассмотрим для



Рис. 14. Распределение вероятности *р* (α, | *F*_B|) на комплексной плоскости.

Для построения наилучшего синтеза Фурье используют не наиболее вероятное значение а, |F| (1), а значение, соответствующее центру тяжести распределения с полярными координатами $a_r, r \mid F|$ (C).

простоты случай, когда единственным атомом, рассеивающим аномально, является тяжелый атом Т; тогда

$$F (\mathbf{H}) = \sum_{j} f_{j} \exp \left(2\pi i \mathbf{r}_{j} \mathbf{H}\right) + f_{T}' \exp \left(2\pi i \mathbf{r}_{T} \mathbf{H}\right) + i f_{T}'' \exp \left(2\pi i \mathbf{r}_{T} \mathbf{H}\right) = F_{\mathrm{E}, T} (\mathbf{H}) + f_{T}'' \exp \left[i\left(2\pi \mathbf{r}_{T} \mathbf{H} + \frac{\pi}{2}\right)\right]. \quad (25a)$$

Центросимметричное отражение имеет амплитуду

$$F(\overline{\mathbf{H}}) = \sum_{j} f_{j} \exp \left[2\pi i \mathbf{r}_{j} \left(-\mathbf{H}\right)\right] + f_{\mathbf{T}}' \exp \left[2\pi i \mathbf{r}_{\mathbf{T}} \left(-\mathbf{H}\right)\right] + i f_{\mathbf{T}}'' \exp \left[2\pi i \mathbf{r}_{\mathbf{T}} \left(-\mathbf{H}\right)\right] = F_{\mathbf{B}, \mathbf{T}}(\overline{\mathbf{H}}) + f_{\mathbf{T}}'' \exp \left[i\left(-2\pi \mathbf{r}_{\mathbf{T}}\mathbf{H} + \frac{\pi}{2}\right)\right]. \quad (256)$$

Соответствующая диаграмма дана на рис. 15. Мы видим, что для $F_{B,T}$ без учета аномального рассеяния закон Фриделя $F_{E,T}$ (**H**) = $F_{B,T}^*$ (**H**) выполняется. Однако мнимая часть f_T'' в обоих случаях имеет фазовый

сдвиг $+\frac{\pi}{2}$; после этого

$$|F(\mathbf{H})| \neq |F(\overline{\mathbf{H}})|. \tag{25b}$$

Учет аномального рассеяния дает возможность, во-первых, определять абсолютную конфигурацию молекул в энантиоморфных кристаллах и, во-вторых, определять положение аномально рассеивающих атомов Т 59-62, для чего в принципе достаточно иметь одну изоморфную производную 63. Эффект аномального рассеяния в исследованиях белковых кристаллов используют чаще всего в комбинации с обычным методом тяжелого атома⁶¹.

Имеется еще одна идея расшифровки структуры белков 64, 65. Уже упоминалось, что некоторые белковые молекулы построены из одинаковых субъединиц S.

Каждая субъединица характеризуется своим векторным набором межатомных ииков $\sum_{S_1} q_{jk}$; набор пиков другой субъединицы $\sum_{S_2} q_{jk}$ такой же, но он ориентирован иначе, и оба они содержатся в функции Паттерсона (14). Построим «самопересечение» этой функции при вращениях:

$$R(\vartheta, \varphi) = \int Q(\mathbf{r}) Q(\mathbf{r}') dv_r, \qquad (26)$$



Рис. 15. Фазовая диаграмма для центросимметричных отражений $F(\mathbf{H})$ и $F(\overline{\mathbf{H}})$ в случае аномального рассеяния.

где $\mathbf{r}' = [C] \mathbf{r}; [C]$ — матрица преобразования координат при вра-

щениях. Функция R обладает тривиальными максимумами при вращениях соответственно кристаллографической симметрии, но будет также иметь и нетривиальные максимумы θ_1 , ϕ_1 совпадений $\sum_{i=1}^{n}$

 $\sum_{\mathbf{S_2}} q_{jk}$, что и определит относительную ориентацию субъединиц. Этот метод применялся при изучении инсулина, но еще не дал существенных результатов.

Основным же методом на сегодняшний день является метод тяжелых изоморфных добавок.

§ 3. СТРОЕНИЕ МИОГЛОБИНА И ГЕМОГЛОБИНА

Миоглобин и гемоглобин-глобулярные белки, обратимо связывающие молекулу кислорода О₂. Гемоглобин красных кровяных те-

лец переносит кислород в токе крови. Присоединение или отдача кислорода регулируются его парциальным давлением, и, таким образом, гемоглобин насыщается кислородом в легких, где его много, и отдает его тканям, где кислород потребляется. Гемоглобин косвенно участвует и в другой стороне дыхательного процесса — выносе СО₂ венозной кровью.

Миоглобин — белок, запасающий кислород в мышцах и расходующий его по мере их работы. Эта функция особенно важна для животных, осуществляющих дыхание с перерывами, поэтому весьма богаты миоглобином мышцы китов, тюленей, дельфинов, пингвинов.

Миоглобин и гемоглобин, кроме белковой части — глобина, содержат простетическую группу — гем



Атом Fe^{++} , лежащий внутри порфиринового кольца, и является непосредственным исполнителем роли мягкого обратимого связывания молекулы O_2 . Однако ни сам по себе атом Fe^{++} , ни этот атом в составе гема такой функцией не обладает, она появляется лишь во взаимодействии гема с глобином. Если же белковый компонент иной, например, в каталазе, также имеющей гемы, то и функция гема становится иной.

Дж. Кендрью и его сотрудники в Кембридже начали рентгеноструктурное исследование миоглобина вскоре после окончания второй мировой войны ^{16, 55, 66-70}. После ряда испытаний они выбрали для исследования миоглобин кашалота, дающий хорошие кристаллы (см. рис. 5). Молекулярный вес этого белка около 18 000, он содержит 153 аминокислотных остатка, т. е. приблизительно 1200 атомов, не считая водородных. Миоглобин имеет одну концевую аминогруппу; это свидетельствует о том, что он состоит из одной полипентидной цепи, не имея цистеиновых S — S-мостиков. Первичная структура миоглобина во время проведения рентгеноструктурного анализа не была известна, теперь она выяснена как в результате самого рентгеновского исследования, так и химическим путем ⁷¹.

Элементарная ячейка влажных кристаллов типа А миоглобина кашалота моноклинная: a = 64,6 Å, b = 31,1 Å, c = 34,8 Å, $\beta = 105,5^{\circ}$, пространственная группа симметрии $P2_1$, ячейка содержит две молекулы белка. Многочисленные пробы позволили найти пять добавок, дающих изоморфные кристаллы: K_2 HgJ₄, AgNO₃, *p*-хлормеркурбензосульфонат, Hg(NH₃)⁺⁺, *p*-иодфенилгидроксиламин и некоторые другие. Нахождение положений тяжелых атомов (см. рис. 11) позволило далее графически определить фазы (см. рис. 13).

Построение проекций не дало существенных результатов. Впервые представление о третичной структуре молекулы миоглобина и белковых молекул вообще дал трехмерный синтез Фурье с разрешением 6 Å (1957 г.) (рис. 16 и 17). Молекула имеет форму несколько уплощенной, трехгранной призмы, размеры ее $25 \times 35 \times 45$ Å. Синтез выявил стержнеобразные сгущения электронной плотности диаметром 5 Å, отстоящие друг от друга примерно на 10 Å и расположенные весьма сложным образом (см. рис. 17). Уже на этой стадии не было сомнений, что это — полипептидная цепь в виде α-спирали. Вследствие недостаточного разрешения сначала нельзя было совершенно точно определить следование цепи, поскольку между стержнями в нескольких местах наблюдались мостики



Рис. 16. Одно из сечений синтеза Фурье многлобина с разрешением 6 Å. *А* — *D* — сечения а-спиралей, *H* — гем.

повышенных значений электронной плотности. Однако на следующей стадии это было сделано совершенно однозначно. Плоский диск со значительной электронной плотностью был идентифицирован как гем.

Следующей стадией явилось построение синтеза Фурье по 9600 рефлексов с разрешением 2 Å ^{55, 68} (1960 г.). Синтез был выполнен в виде



Рис. 17. Трехмерная модель распределения высоких значений электронной плотности в молекуле миоглобина, полученная при разрешении 6 Å, дающая ход полипептидной цепи (темный диск — гем). 96 сечений, перпендикулярных к оси а и отстоящих на 2/3 А друг от друга (рис. 18). Этот синтез отчетливо выявил следование полицептидной цепи. которая в ранее обнаруженных стержнеобразных участках теперь непосредственно разрешилась как правая α-спираль с периодом 5,4 Å (рис. 19). Боковые радикалы R чередуются после поворота спирали на 100° и с осевым интервалом 1,5 Å. Модель молекулы представлена на рис. 20 (см. также рис. 24, а). В α-конфигурации оказалось всего 118 остатков из 153 (т. е. около 70% остатков). α-спираль наблюдается на восьми почти точно прямолинейных участках (прямолинейна ось спирали), в каждом из них от 7 до 24 остатков. На места «изломов» и изгибов приходится около 48 остатков, большинство изломов содержит три остатка, в одном из перегибов содержится восемь остатков, свернутых в виде S-образной петли (верхняя правая часть рис. 17). Хорошо выявилась плоская гемогруппа, лежащая касательно к поверхности молекулы как бы в кармане, образованном из

складок полипептидной цепи (рис. 18, б). Атом железа, вопреки ожиданиям, оказался отстоящим на 0,3 Å от ее плоскости. Координация атома Fe октаэдрическая; он окружен четырьмя атомами N порфиринового кольца и подпирается со стороны молекулы одним из атомов N гистидинового остатка полипептидной цепи. На шестое, наружное место на



Рис. 18. а) Трехмерный синтез Фурье миоглобина с разрешением 2 Å — набор плоских сечений. б) Участок синтеза, соответствующий гему.

расстоянии 2,1 Å и садится молекула кислорода, присоединяющаяся к миоглобину. Исследование распределения электронной плотности в боковых остатках даже при недостаточном разрешении 2 Å позволило все же идентифицировать около 100 из них, и эти данные оказались в хорошем согласии с химическими ⁷¹. Было установлено положение ³/₄ атомов молекулы.

В последние годы уточнение структуры ведется на основе всех 25 тысяч рефлексов, разрешение 1,4 А, фазы находят циклами последовательных приближений 70 (рис. 21). С полной

достоверностью определены положения 120 остатков и остальных 30с большой долей вероятности; разрешились 1100 атомов из 1200. Большинство заряженных и полярных боковых радикалов R (лизин, аргинин, глутаминовая и аспарагиновая кислоты, гистидин, триптофан, серин, тирозин, треонин) расположены на поверхности молекулы, тогда как неполярные остатки находятся внутри молекулы 72.

С помощью метода изоморфных Скоулди 73 побавок исследовала





Рис. 19. а) Вид синтеза рис. 18 вдоль оси одной из а-спиралей. б) Развернутое цилиндрическое сечение синтеза рис. 18 по одной из α-спиралей.

миоглобин тюленя. Построение проекции Фурье с разрешением 4 А и сравнение ее с аналогичной проекцией молекулы миоглобина кашалота показало, что третичная структура — характер следования цепей у этих белков одинакова.

М. Перутц с сотрудниками провел большой цикл исследований различных гемоглобинов 17, 18, 42, 74-80, 120. Молекулярный вес гемоглобина 64 500, молекула содержит около 5000 атомов C, N, О и столько же водородных и четыре атома Fe. Она состоит из четырех попарно равных субъединиц, две из них (α-цепи) содержат 141, две (β-цепи) —146 остатков, всего 574 остатка. Каждая субъединица содержит один гем. Однако молекула гемоглобина — не механическое учетверение протомеров, гемы в ней взаимодействуют: если три из них присоединили О2, то способность четвертого сделать то же самое резко увеличивается.

Известны четыре формы гемоглобина: оксигемоглобин (с О2), восстановленный гемоглобин (без О₂), карбоксигемоглобин («отравленный» прочным присоединением CO), метгемоглобин (с трехвалентным Fe⁺⁺⁺). Еще в 1938 г. Гауровиц ⁸¹ обнаружил замечательный факт изменения

внешнего строения кристаллов гемоглобина при переходе от окси- к вос-

548

становленной форме и обратно, свидетельствующий об изменении строения молекул при реакции с кислородом.



Рис. 20. Трехмерная модель молекулы миоглобина. Стержни-ковалентные и водородные связи, шарик-атом Fe.

Наиболее полные рентгеноструктурные данные были получены для кристаллов, характеристики которых приведены в табл. III.

Таблица III

Гемоглобин	Симметрия, пространственная группа	a, Å	b, Å	c, Å	β	Число молекул в ячейке	
Лошадь (окси) Лошадь (восст.) Человек (восст.)	Моноклинная, <i>С</i> 2 Ромбическая, <i>С</i> 222 ₁ Моноклинная, <i>Р</i> 2 ₁	109,0 77,0 63,4	63,5 81,8 83,6	$54,9 \\ 92,7 \\ 53,9$	110°53′ 99°15′	2 4 2	

В первоначальных работах были установлены форма молекулы, характер ее гидратации (см. рис. 6), наличие в молекуле α-спиралей, взаимная ориентация плоскостей гемов (последнее — методом парамагнитного резонанса) и ряд других особенностей структуры.

Метод изоморфных добавок в сочетании с данными по аномальному рассеянию позволил в 1960 г. получить трехмерный синтез Фурье кристаллов оксигемоглобина лошади с разрешением 5,5 Å (в ряд вошло



Рис. 21. Один из участков синтеза Фурье миоглобина с разрешением 1,4 Å. В центре — гем, проектирующийся вдоль своей плоскости; к нему с одной стороны примыкает остаток гистидина, с другой стороны — молекула воды, ванимающая место связываемого кислорода.

1200 рефлексов) (рис. 22). В качестве изоморфных добавок служили *р*-хлормеркурбензоат, реагирующий с SH-группами β-цепей, дихлормеркурацетат, меркурацетат и некоторые другие. Фазы были определены по центроиду вероятности (см. рис. 14). Электронная плотность полипеп-тидных цепей имеет значение 0,54 эл/Å³ и выше. Если вырезать из всех рассчитанных двумерных сечений ряда Фурье фигуры по такому контуру и наложить их друг на друга, мы получим модель молекулы, изображенную на рис. 22, а. Модель превосходно выявляет α (белые — рис. 22, б) и β (черные — рис. 22, в) субъединицы молекулы, следование полипептидной цепи в них и расположение гемов.

Молекулы расположены на оси 2 ячейки и, таким образом, сами обладают осью 2. Четыре субъединицы компактно уложены в эллипсоид 50 × 55 × 64 Å. Укладка их такова, что приблизительно осуществляется тетраэдрическая точечная симметрия молекулы. Контакт между субъединицами одинакового типа сравнительно мал, вследствие этого вдоль оси 50 Å (совпадающей с истинной осью 2) имеется канал и с обеих сторон выемки. Как и в миоглобине, гемы лежат в специальных «карманах». Атомы железа находятся на расстояниях: Fe_a — Fe_a 36,0 A, $Fe_{\beta} - Fe_{\beta} 34,3 A, Fe_{\alpha} - Fe_{\beta} 25,2 A.$

Комбинирование известных данных о первичной структуре цепей гемоглобина при знании конфигурации цепи, полученной рентгеноструктурным анализом, с подробными известными данными о структуре миоглобина сильно облегчило анализ строения гемоглобина и позволило дать модель третичной структуры с рядом подробностей 80,120 (рис. 24).

РЕНТГЕНОСТРУКТУРНЫЙ АНАЛИЗ БЕЛКОВ

Сравнение первичной структуры, т. е. последовательности расположения аминокислотных остатков R в α - и β -цепях, показывает, что в 78 положениях из 150 имеются замены R, и все же оказалось, что третичная структура обоих протомеров почти тождественна (рис. 22, б, е).





Рис. 22. *a*) Модель молекулы оксигемоглобина лошади: наложенные сечения трехмерного синтеза Фурье с разрешением 5,5 Å (α—белые субъединицы, β—черные, диски гемы, O₂ — место прикрепления O₂). *б*) β-цепь. Указаны положения некоторых R. *в*) а-цепь (перевернута «вверх ногами» по отношению к положению, показанному на рисунке (*a*), после чего хорошо видна близость третичной структуры обоих протомеров).

Еще более поразительным оказался факт такой же близости третичной структуры обоих этих протомеров и миоглобина (рис. 24), который уже существенно отличен от них по первичной структуре. Действительно, если сравнить между собой эти три последовательности, то в них одинаковые позиции занимают всего лишь 20 R. В последних работах ^{120, 121}, стремясь выяснить факторы, определяющие третичную структуру, и связь ее с первичной, Перутц, Кендрью и Ватсон провели сопоставление 18 последовательностей, известных для дыхательных белков: двух миоглобинов и 16 α- и β-цепей гемоглобинов животных разных видов. Оказалось, что среди них идентичные позиции занимают всего 9 R, имеющие, очевидно, жизненное значение для третичной структуры. Действительно, пять из них контактируют с гемом, другие четыре образуют межцепные стабилизирующие связи или определяют изломы α-спиралей.

Однако, по-видимому, не меньшую роль играет другой факт: расположение внутри протомера во всех случаях только неполярных



Рис. 23. α-цепь восстановленного гемоглобина человека (разрешение 5,5 Å) (ср. рис. 22, в).

(гидрофобных) остатков. Неполярные (Н) остатки следующие: гли, ала, вал, лей, илей, фал, про, цис, мет, три, тир; остальные — полярные (П). Число П- и Н-остатков в рассматриваемых белках, как и в большинстве белков вообще, приблизительно равно, т. е. составляет 70-80. Полностью внутри молекулы, т. е. вне контакта с окружающими белок молекулами H₂O, находится 33 остатка. Во всех 18 рассмотренных случаях эти 33 остатка Н-типа, и хотя среди них есть множество замен одних R на другие, все они являются заменами Н ↔ Н, но не Н —> П. Таким образом, за сотни миллионов лет эволюции дыхательных белков мутации, т. е. замены Н + H внутри протомера, не нарушали (а может быть и совершенствовали) их структуру и функцию. С другой стороны,

для 120 остатков, находящихся на поверхности или в ее впадинах (среди них все П), наблюдаются замены любых типов: $H \leftrightarrow \Pi, H \leftrightarrow H, \Pi \leftrightarrow \Pi$. Ниже мы остановимся на существе этих фактов.

Большой интерес представляло сравнение окси- и восстановленного гемоглобина. Для подробного изучения был выбран восстановленный гемоглобин человека ⁷⁹, для которого к тому времени была установлена первичная структура ⁸² и кристаллы которого более удобны для анализа, чем кристаллы восстановленного гемоглобина лошади (см. табл. III). (Полученные результаты были подтверждены и на восстановленном гемоглобине лошади 80.) Были получены три изоморфные производные и построен синтез Фурье электронной плотности с разрешением 5,5 А. Строение α- и β-цепей (рис. 23), т. е. третичная структура, оказалась в пределах ошибок измерений такой же, как и в оксигемоглобине лошади, однако четвертичная структура восстановленного гемоглобина (и человека, и лошади) претерпела одно важное изменение. Оно заключается в следующем: α-субъединицы не изменяют своего взаимного расположения, но β-субъединицы раздвигаются на 7 Å, как бы скользя по поверхности а-субъединиц, так что расстояние а — в не меняется. Лучше всего судить об этом по изменению расстояний между атомами Fe₆ — Fe₆ (рис. 25), которое возрастает от 33,4 до 40,3 А. Этот замечательный эффект изменения четвертичной структуры гемоглобина при ее реакции с О2 Перутц образно назвал «дыханием» молекулы, которая, правда, расширяется не при «вдохе» — присоединении кислорода, а при «выдохе» —



Рис. 24. Близость третичной структуры и β-цепи гемоглобина (слева) и молекулы миоглобина (справа). Остатки пронумерованы; остатки пролина часто находятся на изломах цепи.

его отщеплении и, наоборот, сужается при «вдохе». Тем самым была конкретизирована причина изменения кристаллической структуры при переходе оксигемоглобин — восстановленный гемоглобин ⁸¹. Рентгеновский контроль кристаллов восстановленного гемоглобина лошади и их перехода в кристаллы оксиформы позволил по появлению новых отражений установить, что этот переход осуществляется в две ступени. Сначала процесс идет статистически и получается структура типа разупорядоченного твердого раствора оксимолекул среди восстановленных, а на определенной стадии возникает упорядочение ⁸⁰. Кто мог предположить, что

и к белковым кристаллам приложимы эти «металловедческие» представления? Однако, конечно, наиболее интересен сам эффект изменения строения молекулы, который, по-видимому, вообще характерен для энзиматических реакций, осуществляемых глобулярными белками.

Разрешение 5,5 Å, использовавшееся в описанных исследованиях гемоглобина, не позволяет судить, вызывается ли изменение четвертичной структуры какими-либо незначительными изменениями строения α- и β-субъединиц. Скорее всего, эти изменения малы и они являются сложным результатом смещения равновесия электростатических и прочих сил,



Рис. 25. Схема изменения четвертичной структуры гемоглобина при окислительно-восстановительном процессе: «дыхание» молекулы (штриховые линии соответствуют восстановленной форме).

которые определяют расположение субъединиц, — смещения, инициируемого присоединением (отщеплением), возможно, лишь одной молекулы О₂ ко всей огромной молекуле белка.

Исследования миоглобина и гемоглобина позволили сделать еще целый ряд интересных заключений ⁷⁸⁻⁸⁰. Известны «молекулярные болезни» крови, связанные с тем, что в ней присутствуют вместо обычного те или иные анормальные гемоглобины, в которых некоторые остатки замещены на другие. Так, в плохо окисляющемся гемоглобине М замещены три остатка, и эти три остатка расположены вблизи гема. Из этого можно заключить, что они препятствуют контакту одного из Fe с кислородом. Так называемая серповидная анемия вызвана заменой всего одного остатка № 6 в β-цепи — глутаминовой кислоты — на нейтральный валин. Здесь невозможно объяснить изменение функций молекулы из чисто геометрических соображений, и оно может быть понято, по-видимому, лишь с позиций электронной структуры. Расшифровки гемоглобина и миоглобина явились блестящими достижениями, открывшими новую страницу в рентгеноструктурном анализе и молекулярной биологии. За эти работы М. Перутц и Дж. Кендрью получили в 1962 г. Нобелевскую премию. Ниже мы еще остановимся на общих выводах, касаструктуры белков вообще, сделанных из этих исслеющихся дований.

§ 4. ИССЛЕДОВАНИЯ ЛИЗОЦИМА И ДРУГИХ БЕЛКОВ

В самое последнее время к двум подробно исследованным, описанным выше белкам прибавился еще один — лизоцим, для которого построен синтез Фурье с разрешением 2 Å. Для химотрипсиногена, рибонуклеазы, 10 уфн. т. 88. вып. 3

Б. К. ВАЙНШТЕЙН

карбоксипептидазы построены трехмерные синтезы Фурье с разрешением 3-6 Å, для некоторых других белков — проекции.

В отличие от гемобелков, все названные энзимы обладают S - Sмостиками и содержат мало а-спиральных участков, что создает большие



Рис. 26. Трехмерный синтез Фурье химотрипсиногена с разрешением 5Å (наложение сечений).

стержневых областей повышенной электронной плотности. Ясно, что эти области соответствуют полипептидным цепям, однако имеющиеся их разветвления нельзя однозначно приписать S — S-мостикам либо самой

цепи; таким образом, установить ход цепи при таком разрешении оказалось невозможным. Только один относительно короткий прямолинейный стержень можно было аттрибутировать как а-спиральный участок. На поверхности молекулы имеется «вмятина», возможно, соответствующая активному центру.

Малая информативность такого синтеза, построенного после огромной работы, явилась несколько разочаровывающим фактом, особенно после того, как модели миоглобина и гемоглобина, полученные с разрешением 6 А, позволили получить гораздо больше интерпретируемых данных. Счастливым обстоятельством оказалось высокое содержание в гемобелках *α*-спиралей (~70%, что не было известно заранее), проявившихся как прямолинейные стержни; отсутствие S — S-мостиков позволило однозначно установить следова-

трудности в интерпретации синтезов с разрешением 4-6 Å.

На рис. 26 показан трехмерный синтез Фурье химотрипсиногена с разрешением 5 А поданным Краута 83. Из этого белка (молекулярный вес 25 000. 243 остатка) в разных условиях были получены кристаллы шести типов, два из них оказались удобными для введения тяжелых атомов. Были испробованы 200 различных добавок, четыре из них дали изоморфные кристаллы, что и позволило определить фазы и построить синтез. Эллипсоидальная молекула (40 × \times 40 \times 50 Å) оказалась весьма сложным переплекриволинейных тением



Рис. 27. Трехмерная модель молекулы лизоцима с разрешением 6 Å.

ние цепи и проводить корреляцию с первичной структурой.

Почти столь же мало, как и в случае химотрипсиногена, можно было сказать на основании синтезов Фурье с разрешением 5 и 6 А лизоцима^{84, 85}, полученных в 1962 г. двумя группами исследователей — в Англии и США (рис. 27). Однако недавно завершенная Блейком, Нортом, Филлипсом и сотрудниками работа ⁸⁶ по этому белку с разрешением 2 Å (1965 г.) представляет очень большой интерес, поскольку в ней расшифрована молекула, обладающая совсем иными функциями, чем гемобелки, и, как оказалось, значительно отличающаяся от них по структуре. Лизоцим содержится в тканях многих животных и растений и обладает защитной



Рис. 28. Первичная структура лизоцима.

Сплошная черная линия указывает участки цепи, находящиеся в а-конформации. Подчеркнутые остатки находятся вблизи активного центра, остатки пронумерованы.

функцией — он может растворять некоторые бактерии. Механизм действия этого энзима заключается в разрыве так называемых β-гликозидных связей полисахаридов:



(эта связь указана стрелкой), входящих в стенки бактериальных клеток. Молекулярный вес лизоцима 14 600, последовательность 129 его остатков, среди которых четыре S — S-мостика, известна (рис. 28).

Кристаллы лизоцима белка куриных яиц тетрагональные, пространственная группа $P4_{3}2_{4}2$, a = 79,1 Å, c = 37,9 Å, число молекул в ячейке 8. На разных стадиях исследования использовались различные добавки с тяжелыми атомами; для разрешения 2 Å эффективными оказались шесть: HgJ_{4}^{-} , $PdCl_{2}$, $UO_{2}F_{5}^{--}$ и др. Измерения 9040 отражений были проведены на автоматическом линейном дифрактометре, фазы определены методом центроида. Вследствие высокой симметрии амплитуды 1640 отражений hk0, h0l, hhl действительны, т. е. для них $\alpha = 0$ или π , что облегчило исследование.

Синтез Фурье был выполнен в виде 60 сечений, перпендикулярных к оси с, один блок из 10 сечений показан на рис. 29. Синтез подтвердил

правильность полученной ранее модели с разрешением 6 Å (см. рис. 27), но позволил точно проследить ход полипептидной цепи, выявить α-спиральные участки, S — S-мостики и идентифицировать почти все R как в спиральных, так и в неспиральных участках (хотя атомы не были разрешены). На рис. 30 показана модель молекулы (ср. рис. 28).

Молекула очень приблизительно может быть описана как эллипсоид 45 \times 30 \times 30 Å. В α -спиральной конформации находится 55 остатков из 129, имеется шесть таких участков, некоторые очень короткие (см. рис. 28 и 30). Процент спирализации (\sim 40%) значительно меньше, чем в миоглобине. Характер третичной структуры остальной части молекулы



Рис. 29. Участок трехмерного синтеза Фурье лизоцима с разрешением 2Å.

А — А'-ось одной из а-спиралей, В-другая а-спираль, расположенная приблизительно перпендикулярно к плоскости чертежа. весьма сложен. На участке остатков № 35—80 цепь свернута очень прихотливо, так что три ее отрезка приблизительно антипараллельны и образуют нечто вроде петли. Каждый дисульфидный мостик примыкает по меньшей мере к одному α-спиральному участку.

Сложный характер молекулы не позволяет так исно, как в случае гемобелков, обозначить ее «поверхность» и «внутреннюю часть». Если все же такое разделение произвести, то тенденция расположения гидрофильных остатков на поверхности, а гидрофобных внутри молекулы не проявляется столь четко, как в миоглобине.

Особый интерес представляет значительное продолговатое углубление в молекуле (оно было видно и при разрешении 6 Å), показанное на

рис. 30. Остатки, прилегающие к нему, относятся совсем к различным частям цепи — они отмечены на рис. 28. К этому углублению примыкает очень правильно построенный гидрофобный «карман» из остатков № 28, 108 и 111 триптофана, 105 метионина и 23 тирозина. Это углубление вместе с карманом, судя по всему (в том числе и по химическим данным), является активным центром молекулы, попадая в который молекула субстрата (28) подвергается специфическому воздействию.

Осуществив энзиматическую реакцию, молекулы белка освобождаются от субстрата, что затрудняет изучение лабильного комплекса энзим субстрат. В то же время есть близкие по строению к субстрату вещества ингибиторы, которые (наподобие неточного ключа к замку) «застревают» на молекуле энзима и блокируют его активность.

С лизоцимом был проведен изящный рентгенобиохимический эксперимент⁸⁷, который, по-видимому, явится прообразом многих таких опытов в дальнейшем. Были подобраны ингибиторы (И), близкие по строению к (28), в том числе так называемый N-ацетилглюкозамин, его димер хитобиоза и др.

Ранее при изучении некоторых производных миоглобина было установлено, что если построить разностный синтез Фурье по амплитудам $||F_{\rm E,T}| - |F_{\rm B}||$ и фазам чистого белка $\alpha_{\rm E}$, этот синтез даст электронную

плотность молекулы «довеска» ⁸⁸. Этот прием был применен для установления положения ингибитора.

Кристаллы ингибированного лизоцима оказались изоморфными кристаллами чистого лизоцима и были подвергнуты рентгеносъемке. Синтез по $||F_{\rm E}, u| - |F_{\rm E}||$ и $\alpha_{\rm E}$ с разрешением 6 Å дал максимум электронной



Рис. 30. Трехмерная схема расположения аминокислотных остатков (кружки) в молекуле лизоцима. Остатки пронумерованы в соответствии с рис. 28. Заштрихованные цилиндрики — мостики S — S; а-спиральные участки заштрихованы.

плотности, соответствующий положению молекулы И. Оказалось (рис. 31), что ингибитор действительно размещается в описанном выше углублении молекулы лизоцима, хотя, конечно, точное его расположение можно будет установить только при повышении разрешения.

Расшифровка лизоцима явилась новым крупным достижением рентгеновской кристаллографии белков. Общее состояние исследований в этой области суммировано в табл. IV. (см. также обзоры ^{41, 49, 89, 91}). Мы дадим к ней только некоторые комментарии.

Пятнадцатилетние исследования рибонуклеазы — чрезвычайно интересного белка, энзиматической функцией которого является разрывание цепочки РНК (рибонуклеиновой кислоты) на отдельные нуклеотиды, по-видимому, скоро будут завершены Харкером и его сотрудниками (США) ^{92, 93}. Молекулярный вес этого белка 13 683, он имеет 124 остатка, четыре S — S-мостика. Харкер и его сотрудники получили кристаллы 15 типов; в один из них удалось ввести пять добавок, главным образом органических красителей, содержащих тяжелые атомы. В 1964 г. был получен синтез с разрешением 3 Å. Работавшей параллельно в Англии группе Карлайля ⁹⁴ удалось получить лишь одну производную, и полученный синтез не был достоверен.

Уже более 20 лет ведутся исследования инсулина (4) — белка, управляющего сахарным обменом ^{98.99} (мол. вес 5733), над которым работают

Таблица IV *)

I <u></u>					
Белок (его источник)	Молеку- лярный вес	Симметрия, пространствен- ная группа	Число моле- кул в ячей- ке	Состояние **) исследований	Исследователи, литература (страна) ***)
Миоглобин (ка- шалот)		Монокл., P21	2	3M, 1, 4Å (1963)	Кендрью, Ват- сон ⁶⁶⁻⁷⁰
Миоглобин (тю- лень)	17800	Монокл., А2	2	2M, 2 Å (1963)	(Англия) Скоулди ⁷³ (Англия)
Гемоглобин (ок- си, лощадь)		Монокл., С2	2	3M, 5,5 Å (1959)	Перутц 74-77 (Англия)
Гемоглобин (восст., человек)	67.000	Монокл., P2 ₁	2	3M, 5,5 Å (1963)	Мюрхед, Пе- рутц ⁷⁹ (Анг-
Гемоглобин (восст., лошадь)	1 01 000	Ромбич., <i>С</i> 222 ₁	4	2M, 5,5 Å (1964)	лия) Перутц ⁸⁰ , 120 (Англия)
Гемоглобин (окси, бык))	Ромбич., <i>Р2</i> ₁ 2 ₁ 2 ₁	4	2M, 6 Å (1960)	Норт ⁵ , Грин ⁹¹ (Англия)
Гемоглобин (ми- нога)	18 400	Монокл., С2	8	Эксперимент	Лёв (США)
Рибонуклеаза (бык)	13 683	Монокл., P2 ₁	2	3M, 3 Å (1965)	Харкер, Кар- та ⁴³ , ⁹² , ⁹³ (США)
Рибонуклеаза (бык)	5	То же	2	3M, 6 Å (1962)	(Сши) Карлайль ⁹⁴ (Англия)
Лизоцим (белок куриного яйца)	j	Тетр., <i>Р</i> 4 ₃ 2 ₁ 2	8	3M, 5 Å (1962)	Корей ⁸⁴ (США)
Лизоцим (белок куриного яйца)	14,400	То же	8	3M, 2 Å (1965)	Филлипс, Норт ⁸⁶ (Анг-
Лизоцим (инги-		» »	8	3M,6Å (1965)	лия) Филлипс 87 (Англия)
Лизоцим (инги-	}	Трикл., <i>Р</i> 1	1	3M, 6 Å (1962)	Диккерсон 95 (США)
Химотрицсино- ген А (бык)	25 000	Ромбич., Р2,2,2,	4	3M,4Å (1963)	Краут ⁸³ (США)
Химотрипсин α (бык)	25 000	Монокл., P2 ₁	4	Расчеты	Блоу ⁹⁶ (Анг- лия)
Химотрипсин ү	25 000	Тетр., P42212i	8	Эксперимент	Девис ⁹⁷ (США)
Инсулин (свинья))	Ромбоэдр., R3	12	Расчеты ЗМ	Хочкин ⁹⁸ (Англия)
» »	5 733	Монокл., P2 ₁	12	» 3	Хочкин ⁹⁹ (Англия)
» (бык))	Ромбич., Р2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	16	» 3	Лоу ¹⁰⁰ , 101 (США)
Карбоксипепти- даза (бык)	34 300	Монокл., P2 ₁	2	3M, 5 Å (1965)	Липскомб ¹⁰² (США)
Лактоглобулин (молоко коровы)	35 000	Ромбич., <i>В</i> 22 ₁ 2	4	2M, 4 Å (1963)	Грин ¹⁰³ (Анг- лия)
Папаин С (сок папайи)	22 000	Ромбич., Р2 ₁ 2 ₁ 2	4	2M, 5 Å (1962) 3M, 5 Å (1966)	Дрент ¹⁰⁴ (Голланлия)
Карбонангидра-	30 000	Монокл., P2 ₁	2	2M, 5,5 Å (1965)	Страндберг ¹⁰⁵ (Швеция)
Алкогольдегид- рогеназа (ло-	83 000	Монокл., P2 ₁	2	Эксперимент	Бренден (Шве- ция)
Лактикдегидро-	140 000	Тетр., 142	4	»	Россман (США)
Глюкагон (овца Пепсин (бык)	3 483 34 500	Кубич., <i>Р2</i> ₁ 3 Монокл., <i>Р2</i> ₁	$\begin{array}{c} 12\\4 \end{array}$	» »	Кинг ¹⁰⁶ (США) Андреева ⁹¹ (СССР)

Рентгеновские исследования кристаллических белков

Белок (его источник)	Молеку- лярный вес	Симметрия, пространствен- ная группа	Число моле- кул в ячей- ке	Состояние **) исследований	Исследователи, литература (страна) ***)
Трипсин (бык)	24 000	Ромбич., Р212121	4	Эксперимент	Вайнштейн (СССР)
Цитохром С (ло- шадь)	12 000		-	»	Диккерсон (США)
Глицеральдегид- рофосфат — де- гидрогеназа (краб)	140 000	Ромбич., P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	4		Ватсон 122 (Англия)
Белок вируса та- бачной мозаики	17 400	Спиральная	-	Расчеты	Холмс ¹⁰⁸ (Англия)
Ферритин (ло- шадь)	747 000	Кубич.	432	Изучение чет- вертичной структуры	Гариссон 107 (Англия)

11	p	од	0	л	ж	e	н	и	e	T	а	6	л.	1	V	*)
----	---	----	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	----	---	---	---	---

*) В основном по данным обзора ... В таблицу не вошел ряд данных, касающихся изучения некоторых модификаций различных белков, элементарных ячеек и т. п. (см. обзор 41).
 **) ЗМ и 2М — соответственно трехмерный и двумерный синтез Фурье; далее указано разрешение.
 ***) Указаны руководители исследовательских групп.

две группы — в Англии (гексагональный Zn-инсулин) и США ^{100, 101} (ромбический инсулинцитрат и инсулинсульфат). Предложенные модели не подтверждены прямым построением синтезов Фурье.

Кроме названных выше химотрипсиногена ⁸³ и карбоксипептидазы ¹⁰², обнадеживающие результаты получены для папаина ¹⁰⁴, карбоникангидразы ¹⁰⁵, химотрипсина ⁹⁶, лактоглобулина ¹⁰³. В Советском Союзе исследования кристаллических белков начаты только в двух лабораториях, чего явно недостаточно.

В заключение этого параграфа целесообразно сказать несколько слов о возможностях изучения структуры белков методом электронной микроскопии ¹⁰⁹⁻¹¹¹. Разрешение лучших современных приборов 4—5 Å формально соответствует уже тем низким разрешениям, которые позволяют делать выводы о строении молекул. Основные трудности здесь методические, касающиеся приготовления препаратов. Нужно, чтобы белок закристал-



Рис. 31. Трехмерная модель лизоцима (разрешение 6 Å), на которой заштрихованы области добавочной электронной плотности, выявленные разностным синтезом.

Эти области соответствуют молекуле ингибитора.

лизовался в тонких слоях, далее препарат должен быть контрастирован введением веществ, сильно рассеивающих электроны (например ФВК — фосфорно-вольфрамовой кислоты). Одним из немногочисленных белков, от которых, используя указанные приемы, удалось получить электронномикроскопические снимки, является каталаза ^{110, 111} (мол. вес 250 000—рис. 32). Снимок выявляет совершенно закономерную структуру. Однако, поскольку картина двумерна, выделить изображение отдельных молекул и сделать обоснованные выводы об их трехмерной (хотя бы о четвертичной) структуре трудно. Тем не менее этот путь не является бесперспективным и можно ожидать, что электронная микроскопия белковых кристаллов даст в ближайшее время интересные результаты, особенно



Рис. 32. Электронномикроскопический снимок каталазы. Увеличение 250 000[×].

если учесть сравнительную простоту ее методики по сравнению с колоссальной трудоемкостью рентгенографического анализа.

§ 5. ФАКТОРЫ, ОПРЕДЕЛЯЮШИЕ СТРУКТУРУ БЕЛКОВЫХ МОЛЕКУЛ. СТРУКТУРА И БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ

Синтез белка происходит в рибосомальных частицах клетки (рис. 33)¹¹². Генетическая информация, содержащаяся в последовательности нуклеотидов ДНК (дезоксирибонуклеиновой кислоты), «переписывается» на цепочку



Рис. 33. Упрощенная схема биосинтеза белка.

и-РНК (информационной РНК); и-РНК проходит через рибосому, к которой непрерывно подаются аминокислоты (с помощью другой, так называемой транспортной РНК). По генетическому коду каждой тройке нуклеотидов и-РНК соответствует определенная аминокислота. Таким образом, согласно указаниям цепочки и-РНК рибосома «строчит» полипептидную цепочку, пришивая к ней по одному звену и выталкивая его вместе с уже готовым участком цепи. Следовательно, первый этап биосинтеза белка фиксирует его первичную структуру и последовательность R.

Как же образуется пространственная структура глобулы, в которой, как мы видели, полипептидные цепи свернуты весьма сложным, но единственным для данного белка способом, так что часть их находится «внутри» молекулы, а другая выходит на «поверхность», образуя сложный рельеф из радикалов и функциональных групп. В клетках не обнаружено какихлибо специальных устройств типа трехмерного «штампа», который бы формировал вторичную и третичную структуры. Ряд данных указывает, что эта структура возникает по принципу самоорганизации, т. е. данная цепь в данных условиях может свернуться только в определенную структуру, и никакую другую. Переходы нить — спираль — неупорядоченная глобула хорошо известны в физико-химии полимеров ¹¹³, однако в случае белков необходимо объяснить именно уникальность и определенность возникающей структуры глобулы.

Такая определенность должна диктоваться индивидуальностью R и их последовательностью. Например, известно, что остатки пролина не могут входить в а-конформацию, и, таким образом, их положение в цепи ограничивает возможную длину и размещение а-спиральных участков. Действительно, все остатки пролина в миоглобине и гемоглобине размещаются либо на изломах а-спиралей, либо в неспиральных участках (но в то же время есть изломы и неспиральные участки и без этих остатков ^{72, 78, 121}). В большинстве случаев остатки цистеина CH₂SH замыкаются в дисульфидные мостики S — S-цистина (биосинтез дает только цистеин), и тогда (см. (4) и рис. 28) это замыкание сразу ограничивает возможные трехмерные конформации.

Исследования синтетических полипептидов, состоящих только из одного сорта R, показали, что полипептиды, построенные из R = сер, тре, вал, илей, цис, не образуют а-спиралей, и указанные остатки были названы антиспиральными. Однако статистический анализ расположения R в миоглобине и гемоглобине ^{120, 121} показал, что, хотя некоторые изломы почти полностью состоят из этих остатков, они не менее часто встречаются и в а-спиралях; было также выяснено, что в изломах всегда присутствуют гис, глу, асп.

Уже давно высказывались гипотезы ¹¹⁴, что организующим фактором в образовании глобул может служить тенденция к собиранию неполярных (гидрофобных) остатков внутри белковой глобулы, а полярных (гидрофильных) — на ее поверхности ¹¹⁵⁻¹¹⁷. Такая закономерность действительно проявилась в миоглобине и гемоглобине. Молекулы воды, присоединяясь к полярным R, образуют вокруг глобулы двойной электростатический слой, что экранирует поле этих R и уменьшает свободную энергию. При контакте гидрофобных R с молекулами H₂O последние упорядочиваются, что уменьшает энтропию. Поэтому этим R «выгодно» собраться вместе внутри молекулы и избежать контакта с молекулами воды. Все это ведет к минимуму свободной энергии и увеличению энтропии системы глобула + вода, т. е. стабилизирует ее. В то же время вандер-ваальсово взаимодействие неполярных R достаточно для объяснения притяжения и компактной укладки цепей внутри глобулы ^{72, 78}.

Отметим, что если принять гипотезу о расположении гидрофобных групп внутри молекул, можно понять тенденцию к образованию субъединиц в белках большого молекулярного веса ¹¹⁸. Отношение числа остатков обоих типов в белках колеблется в сравнительно узких пределах. Значит, и отношение «поверхности» к «внутреннему объему» может сохраняться лишь при некотором объеме глобулы. Если его превзойти, то гидрофильным R места на поверхности не хватит. Тогда белкам с большим молекулярным весом «ничего больше не остается», как образовать субъединицы и увеличить за счет этого долю поверхности.

Предположение о том, что первичная структура определяет вторичную и третичную, находит подтверждение в интересных опытах по так называемой обратимой денатурации ², ¹¹⁶, ¹¹⁷. Определенными агентами можно разорвать все S — S-связи в белке (так делалось с рибонуклеазой, трипсином, лизоцимом). Тогда белок теряет свои ферментативные свойства и по всем данным его трехмерная структура разваливается (денатурируется) молекула плавает в растворе в виде неупорядоченной цепочки, в которой, однако, первичная структура — последовательность R — сохранена. Теперь можно другими реагентами восстановить S — S-связи; оказывается, это ведет к восстановлению ферментативной активности и всех свойств глобулярного белка, вплоть до кристаллической структуры. Следовательно, полностью восстанавливается пространственная структура молекул.

Мы перечислили кратко факты, свидетельствующие в пользу гипотезы «самоорганизации» на основе задания первичной структуры. Однако есть другая группа фактов, которые малопонятны с этой точки зрения или противоречат ей. Например, с инсулином (4) опыты по обратимой денатурации не удавались. Непонятно, что определяет правильность замыкания S — S-мостиков между данной парой SH, а не иной, хотя других возможностей замыкания при наличии, например, восьми SH (как в лизоциме и рибонуклеазе) гораздо больше. Тенденция к гидрофильной поверхности слабо выражена в лизоциме (§ 5). Наконец, до последнего времени оставалось загадкой, почему при очень больших различиях в первичной структуре гемобелков их третичная структура в основном тождественна.

Однако все эти факты постепенно получают свое разъяснение, и становится ясным, что принцип самоорганизации в определенных условиях среды должен быть положен в основу понимания путей образования трехмерных структур глобулярных белковых молекул и вообще биологических глобулярных структур из цепных молекул биополимеров. Можно полагать, что трехмерная глобулярная структура, возникающая сразу же после завершения образования всей полипептидной цепочки, вышедшей из рибосомы, является термодинамически наиболее выгодной, наиболее устойчивой в данных условиях, причем ее устойчивость и возможность образования данной уникальной трехмерной конформации подготовлены всем процессом эволюции данного белка. Анализ миоглобина и гемоглобина 120, 121 показывает, что определяющей третичную структуру может быть и не первичная структура, как таковая, а некоторые ее инварианты — сохранение небольшой части фиксированных R в определенных местах цепи и фиксация лишь неполярности (H) других R без требования строгой их индивидуализации. С другой стороны, для большинства ферментов (например, лизоцима, рибонуклеазы) трехмерная конструкция менее стандартна (в них мало α-спиралей), она поддерживается более сложным равновесием сил, гидрофобные взаимодействия играют, по-видимому, относительно меньшую роль. Поэтому для них возможности вариации первичной структуры должны быть существенно меньше.

Принцип самоорганизации на отдельных, трудно идущих ее этапах может быть дополнен вмешательством специальных агентов. Так, например, имеются данные, что быстрая перестройка S — S-связей осуществляется специальным ферментом.

Выясненные в результате биохимических и рентгеноструктурных исследований основы строения глобулярных белков подняли ряд новых вопросов. Один из них — это очень большая доля объема белковых молекул (т. е. и общего числа остатков), не принимающих никакого видимого участия в работе активного центра, который формируется из относительно малого числа остатков. Является ли этот объем только необходимым массивным фундаментом для установленного на нем тонкого ферментативного механизма, способствует ли он работе этого механизма или остался частично как рудимент эволюционного процесса, — не ясно. Разные факты подкрепляют и одно, и другое объяснение. Так, от молекул некоторых белков можно оторвать значительную часть цепи, практически без изменения их ферментативной активности 1, 2. Но в то же время на примере гемоглобина мы видели чувствительность всей структуры огромной молекулы к присоединению к ней всего лишь одной молекулы O₂. Важность структуры молекулы в целом, во всяком случае некоторых белков, особенно ярко видна на примере недавно открытого явления, так называемого аллостерического ингибирования ¹¹⁹, при котором ферментативная активность блокируется присоединением специального ингибитора не в активном центре, а совсем в другом месте молекулы². Только сняв этот «предохранитель», можно запустить ферментативную реакцию, что и служит для регуляции этих процессов. По-видимому, при аллостерической реакции происходит переориентация субъединиц или какое-то другое изменение четвертичной, а может быть, и третичной структуры.

Так или иначе, но каждая молекула данного белка представляет собой сложнейщий, уникально построенный специально для выполнения данной специфической функции пространственный механизм. Поняты отдельные принципы его атомной архитектуры, многие особенности реакций объясняются химической индивидуальностью отдельных радикалов и их комбинаций, для объяснения отдельных фактов привлекаются представления об электронной структуре. Но единого подхода к описанию строения и свойств таких молекул пока не выработано. Белковая молекула — упорядоченная и конденсированная атомная микросистема, стабильная в очень узких условиях и в зависимости от контакта с другими молекулами способная принимать ряд состояний. На повестке дня стоит рассмотрение ее с позиций физики твердого тела, но не периодического, как кристалл, хотя и с некоторой внутренней одномерной псевдопериодичностью полипептидной цепи.

Институт кристаллографии AH CCCP

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- 1. М. Диксон, Э. Уэбб, в сб. «Ферменты», М., ИЛ, 1961. 2. «Ферменты». Сб. статей под ред. А. Е. Браунштейна. М., Изд-во «Наука», 1964. 3. Дж. Гринштейн, М. Виниц, Химия аминокислот и пептидов, М., Изд-во

- 3. Дж. Гринптенн, М. Виниц, Химия аминокислот и нептидов, М., Изд-во «Мир», 1965.
 4. А. Р. Ryle, F. Sanger et al., Biochem. J. 60, 541 (1955).
 5. L. Pauling, R. B. Corey, Proc. Roy. Soc. B141, 10 (1953).
 6. Р. Б. Корей, в сб. «Химия белка», М., ИЛ, 1949, стр. 299.
 7. L. Pauling, R. B. Corey, H. R. Branson, Proc. Nat. Acad. USA. 37, 205, 236 (1951).
 8. Г. В. Гурская, Кристаллография 9, 839 (1964).
 9. W. T. Asthury Proc. Boy Soc. B141, 4 (1953).

- 9. W. T. Astbury, Proc. Roy. Soc. B141, 1 (1953).
 10. W. T. Astbury, Trans. Far. Soc. 34, 378 (1938).
 11. C. H. Bamford, A. Elliot, W. E. Hanby, Synthetic Polypeptides, Acad.
- Ргезя, 1956. 12. Л. И. Татаринова, Б. К. Вайнштейн, Высокомолекулярные соедине-ния 4, 270 (1962).
- 13. W. Cochran, F. H. C. Crick, V. Vand, Acta Cryst. 5, 581 (1952).

- 14. A. Klug, F. H. C. Crick, H. W. Wyckoff, Acta Cryst. 11, 199 (1958).
- Б. К. Вайнштейн, Дифракция рентгеновых лучей на цепных молекулах, М., Изд-во АН СССР, 1963.
 J. C. Kendrew, R. G. Parrish, Proc. Roy. Soc. A238, 305 (1956).
- 17. J. Boyes-Watson, E. Davidson, M. F. Perutz, Proc. Roy. Soc. A191, 83 (1947). 18. W. L. Bragg, M. F. Perutz, Acta Cryst. 5, 277, 323 (1952).
- 19. J. D. Bernal, D. Crowfoot, Nature 133, 794 (1934).
- 20. D. Crowfoot, Nature 135, 591 (1935).
- 21. P. Джеймс, Оптические принципы дифракции рентгеновых лучей, М., ИЛ, 1950.
- 22. M. von Laue, Röntgenstrahl Interferenzen, Frakfurt a. Main, Acad. Verlag. 1960.
- Г. Липсон, В. Кокрен, Определение структуры кристаллов, М., ИЛ, 1956.
 М. А. Порай Кошиц, Практический курс рентгеноструктурного анализа, М., Изд-во МГУ, 1960.
 D. C. Hodgkin, Nature 188, 441 (1960).

- 25. D. C. Пойдкий, Райне 165, 441 (1800).
 26. V. Luzzati, Acta Cryst. 5, 802 (1952).
 27. Ф. А. Брусенцев, В. Ф. Дворянкин, Ж. структ. хим. 4, 465 (1963).
 28. А. К. Вhuiya, E. Stanley, Acta Cryst. 17, 746 (1964).
 29. Б. К. Вайнштейн, И. М. Гельфанд, Р. Л. Каюшина, Ю. Г. Федоров, ДАН СССР 153, 11 (1963).
 20. J. Karla Ady, in Bassemb by Diffraction Methods, vol. 4 (4064). Viewer, Broux
- 30. J. K a r l e, Adv. in Research by Diffraction Methods, vol. 1, (1964), Vieweg, Braunschweig, 1964, crp. 55.
- 31. А. И. Китайгородский, Теория структурного анализа, М., Изд-во АН ССР, 1957. 32. И. М. Руманова, ДАН СССР, 98, 399 (1954); 118, 84 (1958). 33. С. L. Coulter, J. Mol. Biol. 12, 292 (1965). 34. А. L. Patterson, Z. Kristallogr. 90, 517 (1935).

- 34. А. L. Patterson, Z. Kristallogr. 90, 517 (1935).
 35. М. J. Buerger, Acta Cryst. 3, 87 (1950).
 36. М. Бургер, Структура кристаллов и векторное пространство, М., ИЛ, 1961.
 37. Б. К. Вайнштейн, ДАН СССР 78, 1137 (1951).
 38. А. П. Китайгородский, УФН 46, 23 (1952).
 39. В. И. Симопов, ДАН СССР 136, 813 (1961).
 40. М. F. Perutz, Proc. Roy. Soc. A213, 425 (1952); A225, 264 (1954).
 41. «Белки», т. П. гл. I. Б. Лоу, Строение белков, М., ИЛ, 1956.
 42. D. W. Green, V. M. Ingram, M. F. Perutz, Proc. Roy. Soc. A225, 287 (1954). (1954).
- 43. D. Harker et. al., Acta Cryst. 9, 460 (1956).
 44. F. H. C. Crick, B. S. Magdoff, Acta Cryst. 9, 901 (1956).
- 45. Б. К. Вайнштейн, ЖЭТФ 27, 44 (1954).

- 46. W. L. Bragg, Acta Cryst. 11, 70 (1958). 47. D. M. Blow, Proc. Roy. Soc. A247, 302 (1958). 48. D. C. Phillips, Adv. in Protein Crystallography (в печати).
- 49. G. N. Ramachandran, S. Raman, Acta Cryst. 12, 957 (1959). 50. M. F. Perutz. Acta Cryst. 9, 867 (1956).
- 51. M. Rossmann. Acta Cryst. **13**, 221 (1960). 52. L. K. Steinrauf, Acta Cryst. **16**, 317 (1963).

- 53. D. Harker, Acta Cryst. 9, 1 (1953).
 54. D. M. Blow, F. H. C. Crick, Acta Cryst. 12, 794 (1959).
 55. R. E. Dickerson, J. C. Kendrew, B. E. Strandberg, Acta Cryst. 14, 1188 (1961).

- 56. D. M. Blow, M. G. Rossmann, Acta Cryst. 14, 1195 (1961).
 57. C. Bokhoven, J. C. Schoone, G. M. Bijvoet, Acta Cryst. 4, 275 (1951).
 58. G. Kartha, G. N. Ramachandran, Acta. Cryst. 8, 195 (1955).
 59. G. N. Ramachandran, R. R. Avyar, Crystallography and Crystal Perfection. 59. G. N. a an a c fram trian, A. A. Avyar, Grystanography and Grystar reflection, Acad. Press, 1964, crp. 25.
 60. M. Rossmann, Acta Cryst. 14, 383 (1961).
 61. A. C. T. North, Acta Cryst. 18, 212 (1965).
 62. Y. Okaya, Y. Saito, R. Pepinsky, Phys. Rev. 98, 1857 (1955).
 63. S. Raman. Proc. Ind. Acad. Sci. V. L. N 2, Sec. A, 95 (1959).
 64. M. Rossmann, D. Blow, Acta Cryst. 15, 24 (1962); 16, 39 (1963); 17, 1474 (1964).

- (1964). 65. M. Rossmann, D. Blow, M. M. Harding, E. Coller, Acta Cryst. 17, 338 (1964).
- 66. M. M. Blum, G. Bodo, H. M. Dintzis, J. C. Kendrew, Proc. Roy. Soc. A246, 369 (1958)
- 67. G. Bodo, H. M. Dintzis, J. C. Kendrew, H. W. Wyckoff, Proc. Roy. Soc. A253, 70 (1959).

- 68. J. C. Kendrew et. al., Nature 185, No. 4711, 422 (1960). 69. J. C. Kendrew et. al., Nature 190, No. 4777, 669 (1961). 70. Дж. Кендрью, Биофизика 8, 273 (1963). 71. A. B. Edmundsonn, C. H. W. Hirs, Nature 190, No. 4777, 663 (1961).

- 72. J. C. Kendrew, Brockhaven Symp. in Piology, No. 15 (1962).
 73. H. Scouloudi, Pioc. Roy. Soc. A258, 181 (1960).
 74. W. L. Bragg, M. F. Perutz, Proc. Roy. Soc. A225, 315 (1954).
 75. M. F. Perutz et. al., Nature 185, 416 (1960).
 76. A. F. Gullis, H. Muirhead, A. F. Perutz, M. G. Rossmann, Proc. Box Soc. A265 15 464 (1962). Roy. Soc. A265, 15, 161 (1962).
- 77. M. F. Perutz, Sci. Amer. 211, 64 (1964). 78. M. F. Perutz, Proteins and Nueleic Acids. Elsevier, 1962.
- 79. H. Muirhead, M. F. Perutz, Nature 199, No. 4894, 633 (1963).

- 75. H. Multrie a.d., M. F. Perutz, Nature 199, No. 4894, 653 (1965).
 80. M. F. Perutz et. al., Nature 203, No. 4946, 687 (1964).
 81. F. Haurowitz, Zs. physiol. Chem. 254, 266 (1938).
 82. G. Brannitzer, Zs. physiol. Chem. 325, 283 (1961).
 83. J. Kraut et. al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 48, 1417 (1962).
 84. R. H. Stanford, R. E. Marsh, R. B. Corey, Nature 196, No. 4860, 1176 (1962). 1962)
- 85. C. C. Blake, R. Fenn, A. C. T. North, D. C. Phillips, R. J. Poljak, Nature 196, No. 4860, 1173 (1962). 86. C. C. B l a k e, A. C. T. N o r t h, D. C. P hillips et al., Nature 206, No. 4986, 757, 44065
- 757 (1965). 87. L. N. Johnson, D. C. Phillips, Nature 206, No. 4986, 761 (1965).
- 88. L. Stryer, J. C. Kendrew, M. C. Watson, J. Mol. Biol. 8, 96, 166 (1964).

- 89. А. Rich, D. W. Green, Ann. Rev. Biochem. 30, 93 (1961).
 90. R. E. Dickerson, The Proteins, Vol. 2, Acad. Press, 1964, стр. 603.
 91. Н. С. Андреева, Усп. совр. биол. 58, 3 (1964).
 92. D. Harker et. al., Acta. Cryst. 15, 144 (1962).
 93. G. Kartha, D. Harker, J. Bello, F. E. DeJarnette, Asp. Protein Structure, Acad. Press. 1964, стр. 13.
 94. C. H. Carlisle, B. A. Palmar, Acta. Cryst. 15, 129 (1962). E. De Jarnette, Aspects of

- 94. C. H. Carlisle, R. A. Palmer, Acta. Cryst. 15, 129 (1962).
 95. R. E. Dickerson et al., Nature 196, No. 4860, 1178 (1962).
 96. D. M. Blow, M. G. Rossmann, B.A. Jeffrey, J. Mol. Biol. 8, 65 (1964).
 97. P. B. Sigler, D. R. Davies et al., Proc. Nat. Acad. USA 51, 1146 (1964).
- 98. D. Crowfoot, Proc. Roy. Soc. A164, 580 (1938).
 99. M. Adam, D. C. Hodgkin, et. al.. Тезисы докладов VII Междунар. конгресса кристаллографов (Москва, 1966).

- 100. B. W. Lowet. al., Acta Cryst. 12, 893 (1959); 14, 459 (1961). 101. A. S. McGavin, J. Ralph Einstein, B. W. Low, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 48, 2150 (1962).
- 102. W. L. Lipscomb et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 53, 396 (1965).
- 103. D. W. Green et al., Acta. Cryst. 16, A77 (1963). 104. J. Drenth, J. Mol. Biol. 5, 398 (1962).
- Tilander, B. Stranberg, K. Fridborg, J. Mol. Biol. 12, 740 105. B. (1965).
- 106. M. V. King, J. Mol. Biol. 1, 375 (1959).
- 107. P. M. Harrison, J. Mol. Biol. 1, 69 (1959); 6, 404 (1963).
 108. K. C. Holmes, R. Leberman, J. Mol. Biol. 6, 439 (1963).
 109. H. Fernandez-Moran et al., Science 145, 950 (1964).
 110. R. C. Valentine, Nature 204, 1262 (1964).

- 111. Б. К. Вайнштейн, Н. А. Киселев, В. Л. Шпицберг, ДАН СССР 197, № 1 (1966).
- 112. V. M. Ingram. The Biosynthesis of Macromolecules, New York, 1965.
- 113. Т. М. Бирштейн, О. Б. Птицын, Конформации макромолекул, М., Издво «Наука», 1964.
- 114. Д. Л. Талмуд, С. Е. Бреслер, ДАН СССР 43, 326 (1944). 115. В. А. Белицер, Усп. совр. биол. 50, 3 (1960). 116. Кацидаал, Adv. Protein Chem. 14, 1 (1959).

- 117. F. Sanger, Adv. Protein Chem. 17, 1 (1962).
 118. H. F. Fisher, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 51, 1285 (1964).
 119. J. Monad, J-P. Changeux, F. Jakob, J. Mol. Biol. 6, 306 (1963).
- 120. M. F. Perutz, J. Mol. Biol. 13, 646 (1965).
 121. M. F. Perutz, J. C. Kendrew, H. C. Watson, J. Mol. Biol. 13, 669 (1965).
 122. H. C. Watson, L. I. Banaszak, Nature 204 (No. 4962), 918 (1964).

.