

КОНФИГУРАЦИЯ БЕЛКОВ В РАСТВОРЕ *

С. Дж. Лич

ОГЛАВЛЕНИЕ

1. Введение	1104
2. Модель α -спирали	1105
3. Переход спираль — клубок	1106
4. Теории конфигурационных изменений в белках	1107
5. Дейтеро-водородный обмен	1110
6. Оптическое вращение и дисперсия вращения	1113
А. Теория оптического вращения	1114
Б. Вращательно-оптические свойства полипептидов и белков	1116
7. Третичная структура белков	1125
А. Дисульфидные связи	1126
Б. Водородные связи между боковыми цепями	1128
В. Гидрофобные, или неполярные связи	1130
8. Выводы	1131

1. ВВЕДЕНИЕ

Большинство исследований в области конфигурации белков, т. е. трехмерного расположения полипептидных цепей, в конечном счете сводилось к установлению связи между формой молекул и их биологическими функциями. Современные представления о структуре белков являются результатом синтеза двух основных линий исследования. Первоначальная линия исследования, использовавшая методы классической биохимии, касалась преимущественно растворимых («глобулярных», или «корпускулярных») белков, их кристалличности, денатурации и физиологической активности. Позднее, в 1930 г., методы рентгеновской кристаллографии открыли другой путь изучения конфигурации больших молекул, в связи с чем необходимо в первую очередь упомянуть Астбери^{1, 2}. Этими методами большинство данных было получено для нерастворимых фибриллярных белков. Первоначально Астбери показал, какие изменения происходят в молекулярной конфигурации (при так называемом альфа-бета превращении, усадке, сверхсокращении), подвергая эти фибриллярные белки физическим воздействиям и исследуя соответствующие изменения рентгеновской картины. Проводя эти исследования на разных объектах, начиная от шерстяных волокон и кончая коллагеном^{3, 4} и белковыми волокнами мышц⁵, Астбери выяснил, что эластические свойства волокон кератина, коллагена и миозина имеют место, в конечном счете, благодаря конфигурации и ориентации индивидуальных полипептидных цепей.

Несмотря на то, что данный обзор касается преимущественно белковых молекул в растворе, и, следовательно, здесь упоминается о фибриллярных белках лишь вскользь, очень важно отметить, что Астбери смог воспроизвести рентгеновскую картину, характерную для альфа-бета перехода, растягивая пленки денатурированных глобулярных белков, таких, как эдестин и яичный альбумин^{6, 7}. Это обстоятельство было

* S. J. Leach, Reviews of Pure and Applied Chemistry, 9, 33 (1959). Сокращенный перевод с английского Р. А. Кульмана, под ред. В. А. Пчелина.

использовано для интерпретации молекулярных изменений в растворе с точки зрения разворачивания и свертывания полипептидных цепей, порядка и беспорядка в протеинах. С появлением этой концепции до некоторой степени прояснился процесс денатурации протеинов, в настоящее время рассматриваемый как сложное конфигурационное изменение белковой молекулы (ср. ⁸).

2. МОДЕЛЬ α -СПИРАЛИ

В течение последних десяти лет исследования конфигураций молекул белков развивались в направлении, обусловленном двумя важными открытиями. Одно из них — установление Зангером и сотрудниками⁹ полной последовательности аминокислот в молекуле инсулина, что открыло возможность аналогичных исследований других протеинов и ферментов и дало новые предпосылки для объяснения зависимости между структурой и биологической активностью белков¹⁰. Однако такой подход к пониманию биологических функций без знания молекулярной конфигурации оказался безуспешным. Другим важным стимулом¹¹, появившимся в 1950 г. в результате синтеза теоретических и экспериментальных методов, было установление полной структуры пяти кристаллических аминокислот и пяти простых пептидов при помощи рентгеновского анализа. Из этих данных Полинг, Кори и другие получили размеры длин связей и валентные углы пептидной группы $-\text{CO}-\text{NH}-$ и окончательно установили плоскостность и *транс*-конфигурацию этой группы. Кроме того, было обнаружено, что всегда образуется максимально возможное число $\text{NH}\cdots\text{O}$ водородных связей и что эти связи всегда приблизительно линейны. Полинг и Кори использовали эти данные для модели полипептидной цепи с целью найти ее наиболее устойчивую конфигурацию, т. е. конфигурацию с минимальной потенциальной энергией. В предположении, что около $\text{C}-\text{C}$ и $\text{C}-\text{N}$ одиночных связей в пептидной группе имеет место свободное вращение, было найдено лишь две конфигурации, совместимые с вышеуказанными предположениями. Аналогично ранней модели Хаггинса¹² и более поздней модели « π -спирали» Лоу и Бэйбатта^{13, 14} найденные две структуры оказались спиралями и были названы α - и γ -спиралями.

α -Спираль с 3, 7 остатками на виток спирали и более плотной упаковкой была предложена в качестве основной структуры для «нативных» свернутых молекул белков¹⁵. Детальное описание α -спирали и доказательства ее существования в полипептидах и белках можно найти во многих обзорах^{16–20}. Эта модель широко использовалась как наиболее устойчивая; она является единственной, которой удовлетворяют экспериментальные данные. Убедительное доказательство существования α -спирали было получено при изучении свернутых синтетических полипептидов, в особенности поли- γ -бензил-*l*-глутамата^{17, 18}, тогда как рентгеновские картины фибриллярных белков в нерастянутом виде (α -конфигурация) согласуются с моделью, напоминающей несколько α -спиралей, искаженных скручиванием в канатоподобные структуры^{21–24} (см. также ²⁵).

В свое время главным значением модели α -спирали был стимул к дальнейшим исследованиям. В добавление ко многим чисто физическим исследованиям изменений формы были также сделаны попытки интерпретировать ферментативное действие и конфигурацию активных центров²⁶, равно как свойство электронной проводимости^{27–29} с точки зрения структур, свойственных α -спирали. В самом деле, когда известна последовательность аминокислот в белке, возможно использование α -спирали в качестве основы для построения трехмерной масштабной модели белковой молекулы, что было сделано для инсулина^{19, 30, 31} и части молекулы цитохрома C^{32} .

Первоначальные экспериментальные доказательства существования α -спирали в аморфных и кристаллических глобулярных протеинах отрывочны и неубедительны^{19, 33-39}.

Наиболее полные данные, которые мы имеем сейчас в области структуры белков, были получены для кристаллического миоглобина Кендрю с сотрудниками^{33, 40, 41}. Их подход к получению данных заключался в использовании классического метода «изоморфного замещения» (впер-

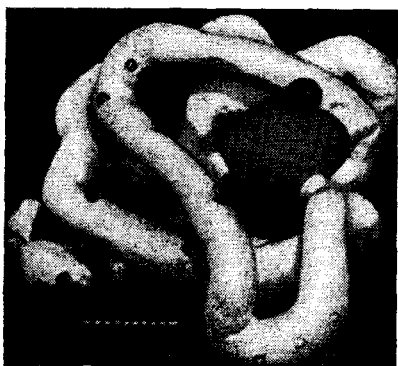


Рис. 1. Модель третичной структуры молекулы миоглобина, по данным Кендрю и других^{33, 40, 41}. Серый диск — гем-группа

вые примененного к белковым проблемам Перутцем⁴²), когда протеин «помечается» тяжелыми атомами в специфических положениях: Кендрю с сотрудниками смогли получить кристаллы миоглобина, помеченного в четырех таких точках, и провести трехмерный анализ Фурье (или расчет электронной плотности) с использованием 400 рентгеновских рефлексов.

Таким путем Кендрю с сотрудниками смогли изобразить первую пространственную картину белка (см. рис. 1).

«Молекула, представленная таким образом, на самом деле является странным объектом. Она является более сложной и менее регулярной, чем мы предполагали, или чем могла бы предсказать любая современная теория глобулярных белков... Если и имеются общие принципы строения

белка, то они совсем не выявляются в данной модели»^{43 *}.

3. ПЕРЕХОД СПИРАЛЬ — КЛУБОК

Наряду с развитием методов изучения растворов были достигнуты важные успехи в области теории конфигурационных изменений макромолекул. В последнее время были сделаны попытки создать теоретические модели, которые объясняют поведение полипептидов и белков в условиях денатурации. Можно рассматривать два крайних случая: полностью упорядоченную и полностью беспорядочную конфигурацию. Проблема заключается в объединении этих форм в одну молекулярную модель и нахождении их относительного содержания при изменениях растворителя и температуры. Двум крайним случаям будут соответствовать хорошо известная α -спираль и полимерный беспорядочный клубок^{**}. Спираль будет обладать минимальной конфигурационной (или внутренней) энергией, тогда как беспорядочный клубок будет обладать максимальной энтропией. Наиболее вероятное равновесное состояние модели будет определяться таким взаимоотношением двух форм, которое обеспечит минимум свободной энергии для всей системы. Такие вычисления были предприняты рядом авторов⁸⁶⁻⁸⁹. Первый и наиболее важный шаг заключается в подсчете изменения свободной энергии при

* Впоследствии Кендрю с сотрудниками, использовав 9600 отражений, получили распределение электронной плотности в миоглобине с разрешающей способностью 2 Å. На полученном распределении α -спирали выявились непосредственно⁴³⁻⁴⁷. Это прямое доказательство существования α -спиралей в глобулярных белках.

Данные, полученные другими методами для растворов полипептидов и белков, не дают столь прямых доказательств существования α -спирали⁴⁸⁻⁸⁵, какие могут быть получены при рентгеноструктурном анализе монокристаллов белков.

** В этом случае обычно говорят «беспорядочная спираль» (random coil), хотя под спиралью не подразумевают никакой регулярности.

переходе одного моля полипептида от α -спиральной конфигурации к беспорядочному клубку. Поскольку считают, что такой переход имеет место при денатурации белков, это привлекает к себе большое внимание. Это формально аналогично α - β -переходу, который рассматривался Хиллом⁹⁰⁻⁹² с точки зрения статистической механики. Однако при использовании подобных методов необходимо помнить, что α - β -переход имеет дело с переходом от внутри- к межмолекулярным водородным связям при увеличении длины молекулы, в то время как в переходе спираль — клубок мы имеем дело с полной потерей внутримолекулярных водородных связей без необходимости какого-либо изменения длины молекулы. Хилл⁸² рассматривал переход, рассчитывая долю водородных связей, недостающих в α -спирали. Это аналогично дефектам, образующимся в структуре обычного кристалла. Он обнаружил наличие тенденции к разрыву не одиночных, а сразу большого числа связей. Райс, Вада и Гайдушек⁹³ пришли к подобному же выводу, используя простейшую статистическую модель. Они подразделили свободную энергию денатурации на четыре категории, одной из которых является свободная энергия разрушения спирали. Если имеется несколько эквивалентных мест, в которых может начаться разрушение спирали, подход к проблеме может быть осуществлен аналогичным образом, путем вычисления числа вакантных мест в решетке или энтропии смешения вакантных мест в решетке. Таким путем было предсказано, что вначале появится большое число разупорядоченных областей, и дальнейшее увеличение беспорядка будет распространяться скорее от этих областей, нежели от разматываемых концов спирали⁹³. Стоит только появиться таким «активным центрам», как от них быстро начнут распространяться области беспорядка. Этим объясняют резкие конфигурационные изменения при изменении среды — (рН) и температуры — и характеристику этих изменений как «фазовых переходов». Если рассматривать обратный процесс (клубок — спираль), будет видно, что образование первого витка спирали затруднено из-за большого понижения энтропии, однако такой виток в дальнейшем играет роль активного центра стабилизации последующих витков при помощи водородных связей. Если задача рассматривается как статистическая проблема⁹⁴, подобная модель приводит к экспериментально обнаруживаемому резкому конфигурационному переходу. Подобным образом можно установить наиболее удовлетворительный способ превращения спирали в беспорядочную цепь⁹⁵. Переход может происходить либо путем разматывания спирали по типу раскрытия застёжки «молнии» с любого конца при разрыве одной водородной связи, либо путем «тройного разрыва», при котором спираль разрушается изнутри при одновременном разрыве трех водородных связей (см. рис. 2).

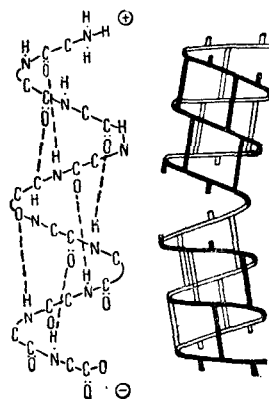


Рис. 2. Схема образования внутреннего разрыва α -спирали при одновременном разрушении трех водородных связей в полипептидной цепи⁹¹

Процесс раскрытия спирали по типу «молнии» обычно играет более важную роль в коротких цепях, а тройной разрыв — в длинных. Комбинируя эти два способа разрушения спирали можно предсказать ситуацию в общем случае⁹⁵.

Процесс раскрытия спирали по типу «молнии» обычно играет более важную роль в коротких цепях, а тройной разрыв — в длинных. Комбинируя эти два способа разрушения спирали можно предсказать ситуацию в общем случае⁹⁵.

4. ТЕОРИИ КОНФИГУРАЦИОННЫХ ИЗМЕНЕНИЙ В БЕЛКАХ

Энергетические соображения при оценке конфигурационных переходов в белках рассматриваются в обзоре Ламри и Эйринга⁹⁶. Более детальное рассмотрение проблемы было произведено Козманом и Пелле-

ром⁸⁹, модель которых сильно напоминает модель Хилла⁸⁸ и которые тоже используют методы статистической механики для установления термодинамически наиболее устойчивого состояния полипептида в растворе. Поскольку используются статистические методы, такая модель приложима лишь к очень большим полипептидам, и при этом не учитываются «концевые эффекты» неполностью связанных концевых остатков. Эта модель принимает во внимание влияние воды на устойчивость водородных связей в полипептидной цепи, но не учитывает взаимодействия воды или неполярных растворителей с углеводородными боковыми цепями, а также взаимодействие между боковыми цепями. Однако такая модель вполне удовлетворительно объясняет резкость перехода спираль — клубок, влияние мочевины как денатурирующего агента, повышенной температуры и концентрации водородных ионов на увеличение беспорядка в водном растворе полипептида.

По всей вероятности, явление перехода спираль — клубок также можно объяснить и с позиции теории Шеллмана^{86, 87}. Хотя эта теория страдает некоторыми ограничениями, в последние годы она так успешно применялась, что заслуживает детального обсуждения. В качестве модели переходных состояний между спиралью и клубком Шеллман рассматривал лишь смеси молекул, которые были целиком либо в одной, либо в другой крайней форме*. Козман и Пеллер, с другой стороны, подсчитали число контактов между сегментами двух типов, полагая, что молекулы в переходном состоянии построены из сегментов со свойствами спирали и беспорядочной цепи. Это может дать более реальную картину частично разупорядоченного состояния. И все же теория Шеллмана более удачна, так как она дает увеличение резкости температуры перехода с ростом молекулярного веса⁹⁸. Это имеет место потому, что статистические теории, подобные теории Козмана и Пеллера, пригодны лишь в тех случаях, когда свободные энергии полипептидных остатков принимаются независимыми от размеров сегмента, в котором они локализованы. Мы уже видели, что свобода вращения (и, следовательно, энтропия) сегментов, принадлежащих беспорядочной цепи, быстро увеличивается при увеличении размеров сегмента. Статистическое приближение будет приводить к недооценке этого факта и поэтому будет расширять область переходной температуры. Сверх того, поскольку эта теория предполагает очень большой набор частиц, она не способна отразить влияние длины цепи на устойчивость спирали, тогда как теория Шеллмана не страдает этим недостатком. Рассчитывая свободную энергию перехода спираль — клубок ($\Delta F_{\text{разверт.}}$) Шеллман суммировал долю каждого остатка ($\Delta F_{\text{ост.}}$) и добавлял некоторый член C , который учитывает «ослабление», вызванное деформированными водородными связями на концах цепи:

$$\Delta F_{\text{разверт.}} = n\Delta F_{\text{ост.}} + C, \quad (1)$$

где n — число остатков в цепи; $\Delta F_{\text{ост.}}$ определяется из теплоты ($\Delta H_{\text{ост.}}$) и энтропии перехода ($\Delta S_{\text{ост.}}$) при нарушении одного моля водородных связей:

$$\Delta F_{\text{ост.}} = \Delta H_{\text{ост.}} - T \cdot \Delta S_{\text{ост.}} \quad (2)$$

Тепловой эффект водородной связи для $\text{OH} \cdots \text{N}$ или $\text{O} \cdots \text{HN}$ взаимодействия оценивается в 6—8 ккал/моль^{99, 100}. Однако в водных растворах присутствие воды (в концентрации 55 М) значительно снижает эту величину. Вообще, реакции разрыва пептидных водородных связей в

* Эти ограничения не применяются в более современных теориях, в которых рассматриваются частично упорядоченные молекулы⁹⁷.

воде на самом деле являются перераспределением водородных связей, когда общее число связей не меняется^{86, 89, 101, 102}, как показано на рис. 3.

Если старые связи лишь слегка прочнее новых, то поглощенное тепло в реакции, вероятно, менее чем 6—8 ккал/моль*.

Шеллман установил, что истинное значение $\Delta H_{\text{ост.}}$ должно быть ближе к 1,5 ккал/моль**; это было получено при изучении термодинамических данных по ассоциации мочевины в воде, где имеет место аналогичный обмен связями. Выигрыш в энтропии ($\Delta S_{\text{ост.}}$) при разрыве водородной связи был определен подобным же образом путем расчета числа новых конфигураций, которые могут образоваться при вращении около связи. Это значение энтропии лежит между 3 и 7 э. е., причем наиболее вероятным является 3—4 э. е.***. Подставляя это значение в уравнение (2), можно рассчитать стабилизирующую энергию ($\Delta F_{\text{ост.}}$) при 25°, которая будет равна 0,3—0,6 ккал/моль, так что уравнение (1) теперь можно записать так:

$$\Delta F_{\text{разв.}} = 0,45n - 4,55 \text{ ккал/моль.} \quad (3)$$

Числовые коэффициенты являются

средними значениями предельных, предложенных Шеллманом.

Уравнение (3) весьма существенно, поскольку оно показывает, что благодаря деформации водородных связей на концах спирали, размеры последней должны быть больше, нежели критическая величина устойчивости (15—20 остатков), а α -спирали в водных растворах находятся на грани устойчивости. Взаимодействие боковых цепей может повышать или ослаблять устойчивость свернутой конфигурации, которая сама по себе обладает малой устойчивостью. Дисульфидные связи (раздел 7, А) или другие взаимодействия боковых цепей (разделы 7, Б и 7, В) обуславливают образование «петель», которые благоприятствуют образованию спиральной формы «вследствие лишения развернутого состояния его главной особенности: конфигурационной свободы»⁸⁶. Аналогичным образом, стягивающие силы вдоль цепи будут проявляться в смежных неполярных или способных к образованию водородных связей боковых цепях, что очень сильно благоприятствует свернутой форме. С другой стороны, при высоких или низких значениях pH электростатическое отталкивание вдоль отдельных цепей благоприятствует растянутой форме (раздел 6, Б) и, следовательно, способствует кислотной или щелочной денатурации. Уравнения (2) и (3) также показывают,

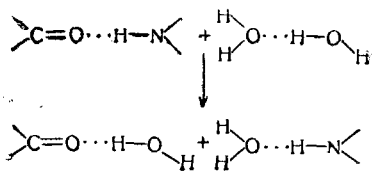


Рис. 3. Иллюстрация перераспределения водородных связей, которое имеет место, когда пептидные водородные связи разрываются водой (по Козману¹⁰¹)

* Германс, Лич и Шерага¹⁰³ предложили верхний предел порядка 6 ккал/моль для теплового эффекта водородной связи, исходя из измерений на гидроксibenзойной кислоте, где имеются «идеальные» условия для образования таких связей. Шерага с соавторами¹⁰⁴ дают значение 6 ккал/моль в своих расчетах по ионизации^{104, 105}, протеолиту¹⁰³⁻¹⁰⁸, ассоциации^{109, 110} и денатурации¹¹¹, хотя эта величина может быть больше. Недавние работы по денатурации β -лактоглобулина теплом и мочевиной позволили Шеллману⁸⁷ установить значения теплового эффекта (1,90 ккал/моль), энтропии (5, 6 э. е.) и свободной энергии (0,21 ккал/моль) для образования водородных связей на одну пептидную группу. Другие экспериментальные данные по энергии стабилизации выводятся из энергии электростатического отталкивания, необходимой для разрушения спирали поли-L-глутаминовой кислоты¹¹². То обстоятельство, что для этого должно быть ионизировано 40% карбоксильных групп, приводит к верхнему пределу в 0,3 ккал/моль.

** Пеллер к этому добавляет 0,5 ккал/моль на увеличение энергии связи, когда электроны локализованы в большой решетке. Такой стабилизирующий эффект обсуждается в другом месте^{27, 113}.

*** Пеллер предпочитает значение 6 э. е.

что свободная энергия разворачивания является линейной функцией температуры. Рассчитанная температура перехода (при которой $\Delta F_{\text{разв.}} = 0$) строго зависит от принятых значений $\Delta S_{\text{ост.}}$ * и $\Delta H_{\text{ост.}}$ и равна 100° , если $\Delta S_{\text{ост.}}$ составляет 4 э. е. При увеличении длины цепи полипептида температура перехода также растет, и переход становится более резко выраженным (раздел 6, Б).

Денатурация мочевиной может быть рассмотрена подобным же образом с использованием термодинамических данных димеризации мочевины и в предположении, что две группы в каждом открытом пептидном звене способны образовывать водородные связи. В соответствии с полученными данными, была предсказана критическая концентрация мочевины, выше которой наступает внезапное разворачивание. Эта концентрация аналогична температуре перехода; с увеличением длины цепи разворачивание происходит более резко и требует более высоких концентраций мочевины. Проверка пригодности расчета была получена⁸⁶ обращением процесса при использовании экспериментально полученной температуры перехода (75°) и критической концентрации мочевины (7*M*) для денатурации яичного альбумина с целью расчета термодинамических данных. Это дало величины 2,1 ккал/моль для $\Delta H_{\text{ост.}}$, 6 э. е. для $\Delta S_{\text{ост.}}$ и 0,3 ккал/моль для $\Delta F_{\text{ост.}}$ при 25° . Первое значение, вероятно, включает в себя небольшую долю, обусловленную стабилизацией боковыми цепями. Результат, следовательно, находится в хорошем согласии с предположениями, сделанными Шеллманом. Экспериментальные значения для критической концентрации мочевины и температуры перехода в случае денатурации β -лактоглобулина⁸⁷ равны, соответственно, 5*M* и 65° .

5. ДЕИТЕРО-ВОДОРОДНЫЙ ОБМЕН

Если органическое вещество ввести в соприкосновение с D_2O или со смесью $H_2O - D_2O$, то произойдет быстрое замещение водородных атомов. Вообще говоря, скорость замещения слишком велика, чтобы быть измеренной экспериментально^{114, 115}. В таких условиях, как было обнаружено, имеет место изотопный обмен водорода, связанного с кислородом и серой, но не углеродом. В пленках, волокнах или кристаллах сложных веществ, однако, скорость проникания дейтерия не так высока и может быть иногда измерена. В таких случаях изотопный обмен в действительности может происходить быстро, однако малая скорость замещения приписывается малой скорости диффузии D_2O в образец. Скорость диффузии зависит не только от плотности образца и его толщины, но отчасти также и от степени упорядоченности молекулярной упаковки, например, неупорядоченные или «аморфные» области кератина могут быть помечены дейтерием быстрее, чем упорядоченные, или «кристаллические» области¹¹⁶⁻¹¹⁸. Различные скорости дейтерообмена, однако, могут существовать на молекулярном уровне, т. е. может иметь место гетерогенность активности обмена даже в пределах одной макромолекулы. Это тот случай, которым мы здесь интересуемся, поскольку в водных растворах белки обычно существуют, если не в виде отдельных молекул, то, по крайней мере, в виде небольших групп молекул, и факторы диффузии и кристалличности не имеют силы.

Ленормант и Блоут^{119, 120} из инфракрасных спектров поглощения получили доказательства того, что бычий серумальбумин и яичный альбумин обладают пептидными группами двух сортов. Одни — быстро маркируются дейтерием при комнатной температуре, другие маркируются дейтерием лишь при высоких рН или повышенных температурах.

* Для $\Delta S_{\text{ост.}} = 2$ и 3 Пеллер нашел температуру перехода равной 60 и 227° .

Линдерстрём-Ланг со своей группой в Карлсбергской лаборатории продолжил эти исследования, применяя количественную методику к растворам белков¹²¹⁻¹²⁵. Было показано, что для большинства изученных белков и пептидов число (n) замещающихся водородных атомов в расчете на один моль одинаково в пределах ошибки опыта с числом (H_e), ожидаемым из формулы. Например, мы можем ожидать, что *dl*-лейцилтриглицин со свободными аминокислотными и тремя пептидными NH-группами должен дать 6 замещающихся водородных атомов. Аналогично *dl*-аланилглицин должен обладать 4 такими водородными атомами. Экспериментально получаемая величина для n очень близка к 6 и 4, и замещение в обоих случаях происходит в пределах нескольких минут¹²⁶. В окисленной А-цепи инсулина, если мы включим в рассмотрение не только три конечных атома водорода и 20 пептидных групп, но также и атомы водорода в $-CONH_2$, $-COOH$, $-OH$ и $-SO_3H$ группах боковых цепей, в изоэлектрической области рН, должно быть 41 или 42 замещающихся атома водорода в зависимости от происхож-

ТАБЛИЦА 1

Скорости обмена замещаемых водородных атомов в некоторых белках и пептидах

Пептиды или белки	Условия обмена	Замещаемые водородные атомы		Пептидные водородные атомы (расчетн.)	Быстрое замещение (эксп.)	Медленное замещение (эксп.)	Ссылки на литературу
		теоретич.	эксперим.				
<i>dl</i> -ала. гли.	25°	4	4	2	4	0	126
<i>dl</i> -лей. (гли.) ₃	0°, 25°	6	6	3	6	0	126
А-цепь инсулина	0°, 38°	38—41	38	20	38	0	126
	0°, рН 4,8	36—37	44—47	20	32	5*	83
Инсулин	0°, рН 3	91	89	48	60	29—31	30, 126
	сухой, тв.	91	85—89	48	45	46	126
В-цепь инсулина	0°, рН 2,7	53	51—57	28	33	20	83
Рибонуклеаза (окисленная)	0°, рН 4,7	245	252	129	245	0	30
Рибонуклеаза	0°, 38°	245	240	129	190	50	30
Поли- <i>dl</i> -аланин	0°—20°, рН 2—4,9	33	33	29	23	10	129

* Не принимается во внимание с точки зрения скорости растворения.

дения инсулина (соответственно, бычий или свиной), тогда как для Na_4 соли H_e равно 38. Экспериментальные значения оказались равными 38 и 41, причем и в этом случае замещение закончилось через несколько минут даже при 0°¹²⁶. По существу, такие же результаты были получены Личем и Шерагой⁸³ при использовании более чистых образцов окисленной А-цепи инсулина. Окисленная рибонуклеаза ведет себя аналогично³⁰, все 245 атомов водорода, которые могут быть замещены дейтерием, были быстро замещены при 0°.

Был изучен ряд других полипептидов и протеинов. Тогда как n неизменно было близким к H_e , скорость замещения не была одинаковой для всех атомов водорода. Часть водородных атомов, способных к обмену, замещалась слишком быстро и не могла быть измеренной, и остающаяся часть подвергалась замещению в течение суток при 38°. Это относится к инсулину^{30, 125-128}, окисленной В-цепи инсулина⁸³, поли-*dl*-аланину¹²⁸, β -лактоглобулину¹³⁰ в растворе, а также к пленкам коллагена⁶¹. Некоторые результаты показаны в табл. 1.

Линдерстрём-Ланг предположил³⁰, что медленно замещающиеся водородные атомы обычно включены в водородную связь. Более конкретно было предположено, что большинство таких «медленных» ато-

мов водорода принадлежит пептидным -NH-группам, которые принимают участие в свернутой конфигурации. Эта конфигурация может быть α -спиралью или же каким-либо иным типом вторичной структуры с водородными связями. Это предположение подтверждается тем фактом, что мочевина ускоряет замещение «медленных» водородных атомов³⁰. Если, далее, предположить, что все «медленные» атомы водорода находятся в пептидных группах, то можно установить из табл. 1 долю остатков, находящихся в свернутой форме. Эти величины обязательно будут завышены, так как некоторые боковые цепи связаны друг с другом водородными связями, что также войдет в долю свернутых остатков (см. раздел 7, Б).

Из всех изученных до сих пор соединений, лишь для безводного аморфного инсулина показано, что его молекулы находятся преимущественно в свернутой форме с почти всеми медленно замещающимися пептидными атомами водорода. Однако в растворе при pH 3 из 46 пептидных атомов водорода инсулина, которые могут быть замещены, в спирали замещается не более 30. Эти медленно замещающиеся водородные атомы могут быть затем подразделены на три группы в соответствии с их скоростью замещения. Линдерстрём-Ланг измерил все три константы скорости первого порядка в зависимости от температуры (0, 20, 38,6°). Таким путем была найдена энергия активации для процесса замещения водорода дейтерием, которая приблизительно равнялась 20 ккал/моль. Поскольку для разрыва в спирали должны быть одновременно разрушены три смежных водородных связи, энергия активации на одну связь должна быть 6—8 ккал/моль. Это значение скорее соответствует величине, ожидаемой для вакуума, но не для водного раствора, где гидратация пептидных связей может снизить энергию примерно до 1,5 ккал/моль⁵⁵. Полученная величина может зависеть от механизма, по которому начинается процесс разворачивания спирали. При низких температурах должен иметь место «тройной разрыв» с высокой энергией активации. При высоких же температурах или в присутствии мочевины процесс разворачивания по типу раскрытия застёжки «молнии» может быстро распространиться от нескольких гидратированных разрывов (см. раздел 4, а также рис. 2).

На основе разной активности замещаемых водородных атомов Линдерстрём-Ланг предложил модель молекулы инсулина³⁰. Поскольку «ядро» молекулы инсулина заключено между двумя мецепными дисульфидными связями, 23 наиболее медленно замещаемых NH-атомов водорода располагаются в этой области. Как считают, две поперечные связи стабилизируют спиральную форму ядра. Другие остатки находятся на «концах» молекулы, и, как полагают, не образуют упорядоченных структур, за исключением некоторых остатков вблизи A7—B7 цистина, пространственное положение которых может быть стабилизировано взаимодействием между -COOH или -CONH₂ боковыми цепями или гистидином; следовательно, они должны замещаться с промежуточной скоростью.

Другой тип стабилизации спирали был обнаружен в растворенном поли-dl-аланине¹²⁹, который не имеет ни замещающихся водородных атомов в боковых цепях, ни дисульфидных связей и не проявляет признаков молекулярной ассоциации. Ввиду крайне низкой устойчивости α -спирали в водном растворе является неожиданностью, что она сохраняется в этом случае⁸². В табл. 1 также показано, что 10 из 29 пептидных NH-групп включены во вторичную структуру. Скорости замещения, измеренные при pH от 2,0 до 4,9 и при температуре 0, 10 и 20° позволили установить энергию разрушения спирали посередине. Полученная величина 1,6 ккал/моль значительно ниже, чем для инсулина. Причиной стабилизации в этом случае должно быть сильное гидрофобное взаимодействие между парами CH₃-групп d- и l-остатков вдоль од-

ной цепи*. Четверть всех остатков может находиться на расстоянии до 3,6 Å один от другого.

Имеются и другие интересные данные, которые не включены в табл. 1. Например, кортикотропин овцы (α -АКТГ) — нативный гормон полипептидного строения не обнаруживает признаков вторичной структуры. Леонис и Ли¹³² обнаружили, что гидродинамическое поведение и оптическое вращение гормона соответствует несколько растянутому беспорядочному клубку полиэлектролитного типа. В соответствии с этим все замещаемые атомы водорода реагируют почти мгновенно. По-видимому, в этом случае отсутствие дисульфидных поперечных связей приводит к беспорядочной структуре и, таким образом, свернутая конфигурация совсем не обязательна для биологических функций. Другим примером являются данные Бреслера¹³⁰ по растворам сывороточного альбумина при pH 7 и данные Брэдбури и других⁶¹ по очень тонким твердым пленкам коллагена. Данные по серумальбумину были получены с использованием не дейтериевой, а тритиевой воды. Этот метод стал популярным благодаря легкости оценки замещения. Оказалось, что при всех температурах между 20 и 100° водородные атомы боковых цепей быстро замещаются. Однако атомы водорода пептидной группы не замещаются быстро, пока раствор не будет нагрет до 70°. В этом случае 70% таких водородных атомов замещается почти мгновенно. Оставшиеся водородные атомы реагируют исключительно медленно, пока температура не поднимется до 100°, когда реакция становится быстрой. Резкость разграничения и высокий температурный коэффициент реакции наводят на мысль о кооперативном процессе разрушения структур с водородными связями¹³⁰, причем сразу напрашивается аналогия с процессом «плавления». Вопрос о скорости дейтерозамещения в пленках коллагена⁶¹ не входит в задачу данного обзора, однако интересно, что опубликованы три совершенно различные скорости этого процесса. Частично деградированный материал обменивается с парами тяжелой воды менее чем за 10 минут, тогда как боковые цепи и несвязанные водородными связями -NH-группы замещаются в пределах одного часа. По-видимому, половина -NH-групп коллагена закрыта во внутримолекулярных водородных связях и для их полной дейтеризации требуется 30 дней.

6. ОПТИЧЕСКОЕ ВРАЩЕНИЕ И ДИСПЕРСИЯ ВРАЩЕНИЯ

Применение этой старой методики сделало ее в последнее время важным инструментом для оценки конфигурационных изменений в белках. Вращательная способность нативных белков не может быть рассчитана арифметически исходя из вклада *l*-аминокислот, входящих в состав белка. Более того, оптическое вращение сильно изменяется с природой среды, в которой находится белок, например, с изменением pH растворителя или в присутствии растворенных денатурантов. Для большинства нативных глобулярных белков удельное вращение $[\alpha]_D$ находится в пределах от -30 до -60°, а денатурация мочевиной изменяет эти значения в пределах от -80 до -120°. Лишь в этом случае средняя величина около -100° приближается к сумме оптического вращения отдельных *l*-аминокислот. Это явление было известно довольно давно. В последнее время оно объясняется¹⁰¹ с точки зрения молекулярной структуры. Из всех спектральных характеристик оптическое вращение наиболее чувствительно к изменениям пространственной конфигурации, и этот метод является уникальным для исследования кинетики гидролиза белка¹³³, его денатурации¹³⁴⁻¹³⁷ или ренатурации^{138, 139}.

* Аналогичные соображения можно высказать по поводу поли-*dl*-фенилаланина, который, по-видимому, обладает α -структурой в растворе¹³¹.

Можно было ожидать, что изменение удельного вращения при денатурации имеет место исключительно за счет изменения вращательной способности единичных асимметрических углеродных атомов, вызванного изменением растворителя или внутримолекулярного окружения¹⁴⁰. Сейчас, однако, известно, что свернутая конфигурация нативных белков также дает прямой и существенный вклад во вращение, вклад, который частично или полностью аннулируется при денатурации.

А. Теория оптического вращения

Было сделано несколько попыток вывести общую теорию оптического вращения^{141, 142}, и, используя квантовомеханические методы расчета, применить ее к оптически активным молекулам^{142–154}. Три наиболее удачных результата были получены Кондоном, Олтаром и Эйрингом^{145, 146}, Кирквудом и другими^{144, 149–151} и Моффиттом^{152–154}, причем каждый использовал различные приближения, основанные на совершенно различных предположениях. Из обзоров, сделанных по этой теме в последнее время^{87, 136, 143}, обзор Шеллмана⁸⁷, по-видимому, является наиболее критическим.

Фиттс и Кирквуд^{150, 151} применили теорию поляризуемости для расчета дополнительного удельного вращения полипептидной α -спирали сверх того вклада, который дают отдельные асимметрические остатки. Было допущено предположение, что спираль очень сильно поляризуется по длине, и из простейших моделей были получены значения поляризуемости и анизотропии. Вклад α -спирали во вращение поли- γ -бензил-*l*-глутамата был найден равным -31° . Это находится в хорошем согласии с экспериментальными данными Доти и Янга⁹⁸, которые нашли, что удельное вращение изменяется от $+10,5^\circ$ в дихлорэтаноле, где растворенный полимер находится в форме α -спирали, до $-17,5^\circ$ в дихлоруксусной кислоте, где полимер представляет собой беспорядочный клубок. Если различие в 28° удвоить для компенсации того обстоятельства, что средний молекулярный вес остатка поли- γ -бензил-*l*-глутамата вдвое больше, чем у белков, то изменение будет того же знака и такой же величины, как в случае денатурации многих протеинов^{134, 140, 155, 156}. Это совпадение, по всей вероятности, случайно, так как найденные к тому времени крайние значения⁸¹ отчасти зависели от растворителя, в особенности для случая беспорядочного клубка; нативные же протеины лишь частично спиральны. Теория однако была успешно применена к данным для полипролина II^{157, 158} (см. раздел 6, Б), а также для дезоксирибонуклеиновой кислоты¹⁵⁹.

Теорией, достигшей в настоящее время наибольшего успеха в применении к вращательной дисперсии белков, является теория Моффитта^{152, 153}. Моффитт рассматривал пептидные связи как главные хромофоры. Обычно поглощенный квант света в этих группах вызывает локализованные электронные переходы, обуславливающие две четкие полосы поглощения при 148 и 185 $m\mu$. Если пептидные группы связаны друг с другом водородными связями, как в α -спирали, взаимодействие между ними приводит к тому, что возбуждение более не локализовано и энергию поглощает целая спиральная система^{27, 113}. Тогда сочетание всех электрических моментов будет растягивать каждую длину волны в полосу поглощения. Было обнаружено, что в действительности возможны лишь два новых электронных перехода, один с перпендикулярным и другой — с параллельным моментами по отношению к оси α -спирали. Эти моменты в свою очередь дают две новых сильных полосы поглощения. В этом случае возможно использование уравнений Розенфельда, связывающих $[a]_D$ с длиной волны света, для суммирования долей оптического вращения этих двух полос. Суммирование может быть осуществлено.

методом Шеллмана (⁸⁷, стр. 381, 488), хотя метод Моффитта применялся до сих пор более широко. Такое суммирование приводит к уравнению:

$$[\alpha]_{\lambda} = \left(\frac{100}{M_0} \cdot \frac{n^2 + 2}{3} \right) \left[\frac{a_0 \lambda_0^2}{\lambda^2 - \lambda_0^2} + \frac{b_0 \lambda_0^4}{(\lambda^2 - \lambda_0^2)^2} \right]. \quad (4)$$

Здесь M_0 — молекулярный вес остатка, n — показатель преломления растворителя, λ — длина волны падающего света и a_0 , b_0 и λ_0 — соответствующие сложные константы для вклада двух полос поглощения. В частности, с целью получения выражения, которое можно легко проверить на опыте, две критические длины волны были объединены в λ_0 , которая по расчетам Моффитта равна 200 $m\mu$ для α -спирали. Из преобразования уравнения (4) очевидно, что константа b_0 характеризует изолированную спираль независимо от растворителя, и ее

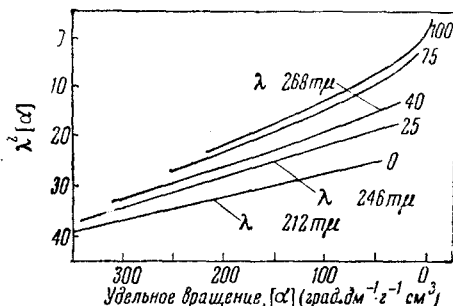
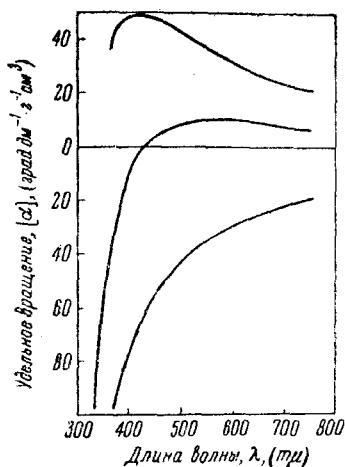


Рис. 4. а — Вращательная дисперсия растворов полимеров типа поли-γ-бензил-L-глутамата и ее зависимость от природы растворителя⁸¹. Верхняя кривая показывает сложную дисперсию, типичную для растворов в несольватирующих растворителях типа хлороформа. Нижняя кривая, соответствующая уравнению Друде (простая дисперсия), была получена для раствора в сольватирующем растворителе типа муравьиной кислоты. Средняя кривая соответствует дисперсии смешанного типа. б — Модифицированная дисперсия для поли-L-глутаминовой кислоты с различной степенью спиральности⁸¹. Цифры справа от кривых указывают процент спиральности.

знак должен определять направление вращения спирали. Как было рассчитано, для правой спирали¹⁵⁴ $b_0 = -580^\circ$, а для левой спирали знак будет обратным*. Вид уравнения (4) означает, что для больших длин волн превалирует первый член, и мы можем ожидать, что будет иметь место простейшая зависимость для дисперсии, предложенная Друде¹⁴¹ **.

$$[\alpha]_D = k : (\lambda^2 - \lambda_c^2), \quad (5)$$

где k — константа вращения, λ_c — константа дисперсии, которую нельзя путать с λ_0 из уравнения (4). Это предположение подтвердилось, причем уравнение Друде удовлетворяется при больших длинах волн. При малых длинах волн, однако, второй член в уравнении (4) становится ощутим, и его величина может служить мерой «аномальной», или сложной дисперсии, обусловленной спиральной конфигурацией (см. рис. 4, а).

* См., однако, второе подстрочное примечание на стр. 1119.

** Уравнение (5) дает лишь первый член уравнения Друде, поскольку он все равно пригоден для данных по дисперсии.

При использовании уравнения (4) важно учитывать, что общее вращение обуславливается не только суммированием собственных вращений всех групп и спирали самой по себе, но также и эффектом взаимодействия боковых цепей друг с другом и каждой боковой цепи со спиралью^{72, 143}. Так, второй (аномальный) член в уравнении (4) возникает из-за спиральной конфигурации, но он не представляет лишь «вращение α -спирали», а включает все эффекты изменений во взаимодействиях, возникающих при переходе от беспорядочной формы к спиральной. Благодаря близости боковых цепей и пептидных групп в α -спирали, эти взаимодействия могут быть достаточно большими⁷². Козман⁷² и Шеллман¹⁶⁰ отмечают, что применимость уравнения (4) не следует рассматривать как доказательство присутствия спиральной конфигурации, поскольку такое уравнение может быть получено в других случаях⁷². Например, даже простые аминокислоты могут давать аномальную дисперсию, если они содержат сильные хромофоры¹⁶¹. Поли- γ -D-глутамат, который не может образовывать α -спирали, обнаруживает $[\alpha]$ и λ_c с изменением pH и растворителя, которые напоминают изменения в белках и полипептидах¹⁶². Тем не менее, успех, который теория Моффитта достигла в применении к экспериментальным данным по синтетическим полипептидам и фибриллярным белкам, делает ее наиболее удовлетворительной теорией.

Б. Вращательно-оптические свойства полипептидов и белков

С 1954 г. накоплено значительное количество данных по оптическому вращению растворов белков для различных длин волн света, преимущественно для видимой области спектра. Принято строить кривые $1/[\alpha] - \lambda^2$ с целью проверки соответствия этих данных первому члену уравнения Друде (5). Оказалось неожиданным с точки зрения уже рассмотренной теории, что такие кривые были неизменно линейными для нативных и денатурированных белков, причем λ_c^2 можно было определять из пересечения кривых с осью ординат, а k — из углов наклона*. Кривизна имеет место лишь ниже 350 $m\mu$ ^{163–165}. На основании первых данных по водным растворам глобулярных белков^{140, 163–165} казалось, что значения λ_c распадаются на две группы. Линдерстрём-Ланг и Шеллман¹⁶⁴ обнаружили, что для водных растворов четырех нативных белков значения константы дисперсии были выше 240 $m\mu$, тогда как значения ниже 230 $m\mu$ были получены в растворах мочевины или щелочи, по-видимому, характеризуют денатурированное или неупорядоченное состояние. Эти низкие значения λ_c были неизменно связаны с очень большими отрицательными значениями удельного вращения. Более новые данные по дисперсии оптического вращения белков, полученные для области длин волн 300–750 $m\mu$, представлены в табл. 2.

Имеются также данные по дисперсии для следующих белков: сывороточный альбумин человека^{173, 174}, яичный альбумин^{70, 87}, β -лактоглобулин^{87, 164, 167}, желатина и коллаген^{164, 175, 176}, лизоцим^{81, 170, 173}, α - и β -химотрипсин^{87, 167, 173}, трипсиноген¹⁶⁷, α -химотрипсиноген^{87, 167, 173}, папаин¹⁷⁰, панкреатическая амилаза¹⁷⁰, такаммилаза¹⁷⁰, фосвитин^{167, 170}, арахин¹⁶⁷, ингибитор трипсина¹⁷⁰, белок Бенс-Джонса¹⁶⁷, α -гликопротеин^{167, 174}, связывающий металл β -глобулин^{167, 173, 174}, γ -глобулин^{167, 174}, клупеин^{87, 164, 168}, окисленная А-цепь инсулина^{87, 164}, окисленная рибонуклеаза^{81, 87, 168, 171}, зеин, глютен и глиадин¹⁷⁷.

Большинство данных после 1957 г. систематизированы Шеллманом и Шеллманом¹⁶⁰, и рассмотрение этих данных вместе с более поздними результатами ведет к следующим выводам.

* Янг и Доти¹⁵⁵ предложили более точный метод построения кривых $\lambda [\alpha]$ от $[\alpha]$ и расчета λ_c^2 из наклона кривых и k — из их пересечения (см., например, рис. 4, б).

ТАБЛИЦА 2

Данные по дисперсии вращения для некоторых белков^{81, 166}

Протеин	Растворитель*	λ_c мμ	$[\alpha]_D^{20}$	Ссылки на литературу
Бычий серумальбумин	ДХЭ—ДХУК (3 : 1)	—	— 22,5	См. также 87, 164, 165—169
	вода, pH 5,0	264	— 63,2	
	ДХУК	242	— 66,0	
	HCl pH 1,9	254	— 77,6	
	8 M мочевины	—	—106	
Меркаптальбумин	вода pH 4,8—5,2	266	—	167
Инсулин	ДХЭ—ДХУК (98 : 8)	300	— 20,0	87, 164
	вода, pH 3,0	265	— 32	
	6 M хлористоводородный гуанидин, pH 8	220	— 65,1	
Инсулин	МК (88%)	230	— 84	См. также 64, 87, 164, 165, 168, 170—172
Бычья рибонуклеаза	этиленхлоргидрин	—	— 23	
	ДХЭ—ДХУК (4 : 1)	290	— 41,1	
	2 M NaCl	231	— 71,5	
	8 M мочевины	220	—103,7	
	6 M хлористоводородный гуанидин	216	—108,1	
Фиброин шелка	LiBr—вода	247	— 23,7	см. также 166
	ДХЭ—ДХУК (1 : 1)	279	— 24,8	
	ТФУК	234	— 77,2	
	ДХУК	242	— 50,8	
Сальмин сульфат	вода, pH 6,4	222	— 88,7	167
	NaOH+2M NaCl	213	— 81,5	
	вода, pH 8,9	223	—	
Альфа-казеин	вода, pH 9,2	218	—	167
Бета-казеин	вода, pH 4,82	213	—	170
Пепсин	вода, pH 3,0	227	—	170

* ДХЭ — дихлорэтан, МК — муравьиная кислота, ДХУК — дихлоруксусная кислота, ТФУК — трифторуксусная кислота.

1. Обычно водные растворы глобулярных белков обладают удельным вращением (для D линии натрия), изменяющимся в пределах от -25 до -80° , когда белки находятся в свернутом, нативном состоянии, и в пределах от -80° до -120° в случае деспирализованного, денатурированного состояния. Удельное вращение в случае полностью деспирализованного состояния определяется собственными вращениями аминокислотных остатков, и в пределах длинной цепи они почти независимы от окружения аминокислоты или даже от состояния ионизации NH_2 - и COOH -групп. Рассмотрение вращений остатков¹⁶⁰ приводит нас к выводу, что среднее вращение на остаток R_m в протеинах равно от -100 до -120° , где

$$R_m = \frac{[\alpha]_D (\text{средний молекул. вес остатка})}{100}$$

Это значение становится более положительным, когда цепи короткие, как в А-цепи инсулина (благодаря «концевым эффектам»), или когда присутствует большое количество тирозина, фенилаланина, триптофана или глицина, как это имеет место в шелке. С другой стороны, более отрицательные величины получаются в случае присутствия большого количества пролина или оксипролина, как это бывает в желатине. Цистин и гистидин также вызывают большую аномалию в величине среднего вращения на остаток. С тех пор как R_m стало известно для каждой аминокислоты, оказалось возможным получить хорошее совпадение экспериментальных величин $[\alpha]_D$ с предполагаемыми для протеинов типа желатины и шелка в развернутой форме¹⁶⁰.

2. В большинстве случаев влияние на $[\alpha]_D$ тепловой обработки и денатурирующих агентов типа мочевины, щелочи и отчасти кислоты очень похоже и не дополняют друг друга при последовательном действии. Для других белков, таких, как химотрипсиноген, α -химотрипсин и рибонуклеаза имеют место большие отрицательные значения $[\alpha]_D$, и считается, что их молекулы частично деспирализованы даже в нативном состоянии, причем 8 М раствор мочевины является наиболее эффективным денатурантом. Сильно сольватирующие растворители типа муравьиной, дихлоруксусной и трифторуксусной кислот также дают в большей или меньшей степени неупорядоченные структуры, однако получаемые при этом значения $[\alpha]_D$ говорят за то, что эти растворители обычно не так эффективны, как 8 М раствор мочевины.

3. Вода сама по себе, по-видимому, действует как агент, разрушающий водородные связи (см. разд. 4), поскольку растворы белков в растворителях типа дихлорэтана или этиленхлоргидрина обычно обладают значениями $[\alpha]_D$ около -20° , что внушает мысль об увеличивающемся свертывании^{172, 178}. Вебер и Тэнфорд¹⁷², измеряя оптическое вращение и вязкость, детально изучили влияние увеличения концентрации этиленхлоргидрина на водный раствор рибонуклеазы. Они сделали вывод, что сначала происходит расширение неспиральной части молекулы. Однако при концентрациях этиленхлоргидрина выше 20% беспорядочные участки постепенно становятся спиральными до тех пор, пока в чистом этиленхлоргидрине молекула не будет вести себя как жесткий стержень. Тэнфорд приписывает это изменение не столько выигрышу свободной энергии при возникновении водородных связей в протеине, сколько тому обстоятельству, что упорядоченная спираль меньше влияет на установление связей между молекулами растворителя¹⁷⁸.

4. Значения константы дисперсии λ_c в водных растворах колеблются примерно от 260 $m\mu$ для сильно свернутых нативных протеинов до 220 $m\mu$ для полностью деспирализованных белков. Максимальное значение λ_c колеблется сильнее, чем минимальное, поскольку степень спиральности весьма различна для различных нативных протеинов. Химотрипсиноген, α -химотрипсин и рибонуклеаза, которые, как мы уже видели, частично развернуты, обладают промежуточными значениями λ_c : 239, 241 и 233 $m\mu$ при рН от 3 до 7¹⁶⁰. Верхний предел для белков типа рибонуклеазы и инсулина может быть поднят до 290 $m\mu$ при использовании этиленхлоргидрина, причем здесь опять напрашивается предположение, что вода разрывает водородные связи.

Эти соображения дали новую основу для сопоставления оптического вращения и конфигурации белковой молекулы. Величины $[\alpha]_D$ и λ_c сами по себе являются полуколичественными критериями доли белка, находящейся в спиральной конфигурации. Чтобы применять эти величины, нам необходимо знать граничные значения для двух крайних конфигураций. Поскольку в случае белков никогда нельзя быть уверенным, что достигаются состояния максимальной упорядоченности или полной деспирализации, Янг и Доти⁸¹ определяли граничные значения $[\alpha]_D$ и λ_c из измерений на синтетических полипептидах. Переводя эти значения на средний молекулярный вес остатка 110, они рассчитали, что удельное вращение белка в спиральной форме будет иметь небольшое положительное значение, выше, примерно, на 100° по сравнению с тем, что дает беспорядочная цепь. Это обстоятельство было позднее подтверждено Доти и Лундбергом¹⁷⁹ на основании изучения поли-L-глутаминовой кислоты. Эти авторы синтезировали полимеры, содержащие в различных пропорциях *d*- и *l*-остатки (γ -бензил-глутамат), определили удельное вращение и дисперсию рацемат-полипептида в α -спиральной конфигурации с одним направлением вращения спирали. Оптическая активность в таких случаях должна иметь место целиком за счет спиральной конфигурации. Эллиотт и другие¹⁸⁰ определяли вращение

и дисперсию¹⁸¹ α -спиралей в полилейцинах и других полипептидах аналогичным методом. Для среднего молекулярного веса остатка 110 Доти и Лундберг нашли, что изменение вращения в случае полной деспирализации было $+103^\circ$. С другой стороны, Шеллман и Шеллман¹⁶⁰ нашли для β -лактоглобулина, который обладает наибольшим изменением вращения из всех белков в растворе, величину $+93^\circ$, которая говорит за то, что этот белок полностью свернут в нативном состоянии.

Принимая, что изменение $[\alpha]_D$ при разворачивании является линейной функцией числа деспирализованных остатков¹⁶⁰, по-видимому, можно сказать, что «каждый градус удельного вращения в белках соответствует изменению на 1% числа остатков в α -спиральной конфигурации»¹⁷⁹, хотя величина нижнего предела подвержена значительным колебаниям по указанным уже причинам. При переходе от 0 до 40% спиральности $[\alpha]_D$ изменится в положительную сторону на 40° , и в тех же пределах λ_c для поли-*l*-глутаминовой кислоты увеличится от 212 до 268 *m\mu*. Эти два значения можно использовать для определения содержания спиральности протеинов, и они должны быть более надежны, чем $[\alpha]_D$. Когда спиральность выше 40%, вклад спирали в общее вращение становится настолько большим, что первый член уравнения Друде уже не удовлетворяется, и появляется кривизна⁸¹ на графике зависимости $\lambda^2[\alpha]$ от $[\alpha]$. Это видно на рис. 4, б. Когда содержание спиральности высоко, данные для полипептидов^{52, 98, 112, 163, 164, 166, 179}, глобулярных белков¹⁶⁶ и фибриллярных белков^{183, 184} лучше согласуются с уравнениями Кирквуда^{150, 152} или Моффитта^{152, 153}, в которых включены члены для аномальной дисперсии спирали. Если используется уравнение Моффитта, и мы полагаем, что λ_0^* для спиральной и неспиральной форм аналогична и равна 210 *m\mu*, то становится возможным определить b_0 в уравнении (4). Значение b_0 для рацемат-полипептида в чисто α -спиральной форме было -500° , хотя экспериментальные значения для других полипептидов^{52, 53, 166} колеблются от -580 до -660° (также см. ¹⁸¹). Это расхождение возникает из-за неидентичности эксперимента и теоретических приближений и не может быть разрешено¹⁷⁹. Величина -600° может быть использована как характеристика 100% спиральности полипептидов^{**}.

Сцент-Дьёрди и Коэн¹⁸⁴ использовали экспериментальное значение -660° для спиральных фибриллярных протеинов. Отношение экспериментальных значений b_0 к 660 дает третий способ определения спиральности¹⁸³.

Все эти определения зависят, кроме всего прочего, от предположения, что спирали одного направления вращения предпочтительнее, чем другого в большинстве белков. Хаггинс¹⁸⁷ предсказал, что правая спираль должна быть более устойчивой, чем левая, и это предположение, по-видимому, подтверждается для синтетических *l*-полипептидов^{180, 181, 188}. Это противоречит утверждению Арндта и Райли³⁹, что

* Из раздела 5 должно быть очевидно, что нет никаких простых зависимостей для λ_0 и λ_c . Первая величина является сложной константой и выводится теоретически, тогда как последняя величина является эмпирической константой, определяемой экспериментально. Они могут быть приравнены друг другу в случае низкого содержания спиральности. Тогда уравнения (4) и (5) становятся идентичными по форме.

** Следует отметить, однако, что значения b_0 для полипептидов не всегда отрицательны, как это имеет место в случае величин, предсказанных Моффиттом для правых спиралей; это было найдено экспериментально Моффиттом и Янгом¹⁵³. Качальский¹⁸⁵ обнаружил аномальные значения b_0 для поли-*N'*-бензил-*l*-гистидина, поли-*l*-тирозина и поли- β -бензил-*l*-аспартата в этиленхлоргидрине. Последний полимер был также изучен Блоутом и Карлсоном¹⁸⁶, которые нашли, что в хлороформенном растворе *l*-полимер дает положительное значение b_0 , тогда как *d*-полимер дает отрицательные значения. Это противоположно поведению глутамата¹⁷⁹. По-видимому, b_0 не является величиной, независимой от природы боковых цепей, как это первоначально предполагали.

левая спираль превалирует в различных глобулярных протеинах. Возможность «смешанной» спиральности предполагал Линдли¹⁸⁹, и если это хоть в небольшой степени имеет место, то интерпретация результатов оптического вращения сильно усложняется. Совсем недавно было показано¹⁹⁰, что абсолютное направление вращения спирали не может быть определено только соответствием уравнению Моффитта. Предположение же, что обычно присутствует лишь одно направление вращения спирали, кажется приемлемым на основании следующих данных.

С одной стороны, изменение удельного вращения при денатурации полипептидов или протеинов идет всегда в одном направлении, и практически для всех исследованных протеинов наблюдается зависимость между экспериментальными значениями $[\alpha]_D$ и λ_c . С другой стороны, спирали с противоположными направлениями вращения приводили бы иногда к очень малым значениям того или другого параметра, что не дало бы, в свою очередь, какой-либо зависимости между ними. Исключения из правил^{167, 170, 173} очень редки и могут рассматриваться как доказательства необычного состава или конфигурации. Например, в случае желатины и коллагена¹⁷⁶ соли сильно влияют на $[\alpha]_D$, но не на λ_c . В этом случае изменения приписываются скорее *цис-транс*-изомерии спирали полипролинового типа, чем описанному выше переходу спираль — беспорядочная цепь (клубок). Кроме того, уравнение Моффитта, полученное для спиралей одного направления вращения, удовлетворяет данным для полипептидов и протеинов с высоким содержанием спиральности. Такой критический подход до сих пор имеет силу, хотя он и является эмпирическим¹⁹⁰. Ряд приблизительных определений степени спиральности различных глобулярных и фибриллярных протеинов в растворе, основанных на значениях $[\alpha]_D$, λ_c и b_0 , показан в табл. 3, которая рассматривается ниже.

а. *Сопоставление методов оценки спиральности.* Основное расхождение между данными можно видеть в колонках 3 и 4 табл. 3. Первые значения были рассчитаны Шеллманом¹⁶⁰ с использованием данных и метода Янга и Доти⁸¹, где значения λ_c сравниваются с аналогичными значениями для синтетических полипептидов. Вторая колонка была рассчитана из данных оптического вращения с использованием метода Шеллмана¹⁶⁰ в предположении, что нативный β -лактоглобулин обладает 100% спиральности. Хотя это предположение достаточно обосновано, данные Шеллмана оказываются явно завышенными в случае присутствия каких-либо развернутых участков молекул. С другой стороны, цифры в третьей колонке могут быть занижены, поскольку определение λ_c предполагает, что вклад в общее вращение каждого остатка не зависит от длины спирали. Такое предположение несомненно верно для длинных полипептидов, но оно может быть неверным для протеинов, сильно «сцементированных» поперечными связями, в которых спирали прерывисты благодаря дисульфидным связям, остаткам пролина или изменению направления главной цепи (см. раздел 2 о миоглобине). Шеллман отмечает, что из термодинамических соображений любой аминокислотный остаток в спирали должен для сохранения конфигурации этой спирали иметь по крайней мере трех соседей. Принимая во внимание некоторую свободу движения концов остатков, это означает, что последовательность из 20 остатков является минимально устойчивым отрезком, и найденная величина спиральности для рибонуклеазы^{81, 166} 14—16% невероятно низка.

В частном сообщении Доти говорит, что недавно были сделаны определения спиральности 8 протеинов в воде и в этиленхлориде. Они были сделаны для проверки уравнений Моффитта¹⁸⁹ и возможности замены его аналогичным, но эмпирическим выражением. Новые величины не сильно отличаются от данных в колонках 6 и 7 табл. 3: для рибонуклеазы, инсулина, яичного альбумина, бычьего серумальбумина, лизо-

ТАБЛИЦА 3

Приблизительные определения спиральности глобулярных и фибриллярных протеинов

Белок	Растворитель*	% остатков в спиральной форме					
		из данных по k_c (см. ⁸¹)	из данных по $[\alpha]_D$			из данных по b_0^{***}	
			(см. 160)	(см. ⁸¹)	(см. 160)**	(см. 160)	(см. 183, 184)
Рибонуклеаза	вода	14	39	20	16		
	МК—ДХЭ						
	50/50 по объему	44		55			
	ЭХГ					65	
Инсулин	вода	38	66	61	50		
	ДХУК	16		24			
	ДХЭ—ДХУК						
	92/8 по объему	62		75		40	
	ЭХГ						
β-Лактоглобулин	вода	28	100****				
Овальбумин	вода	39	79		48		
	ЭХГ					78	
Бычий серумальбумин	вода	38	56		48		
	ЭХГ					58	
γ-Глобулин	вода		47				
Лизоцим	вода	30	46				
Пепсин	вода		24				
Химотрипсин	вода	21	47				
Химотрипсиноген	вода	19	39				
Глобин (миоглобин)	вода				48		
	ЭХГ					85	
Гистон	вода				40		
	ЭХГ					70	
Фиброин шелка	ДХУК—вода						
	(15 : 85 по объему)	100					
	ДХУК	20					
	ТФУК	0					
	LiBr—вода						
	(54 : 46 по объему)		40				
Тропомнозин	ЭХГ					100	
	вода				89		94
Фибриноген	вода						32
Миозин	вода						56
Парамиозин	вода						91
Тяжелый меромиозин	вода						45
Легкий меромиозин	вода						74

* МК — муравьиная кислота, ДХЭ — дихлорэтан, ДХУК — дихлоруксусная кислота, ЭХГ — этиленхлоргидрин, ТФУК — трифторуксусная кислота.

** Приближенные значения (цитированы по Имаиори¹⁶⁰) для водных растворов.

*** Приближенные значения, полученные¹⁶⁶ при делении b_0 на 600, исключая последние шесть фибриллярных белков, для которых было найдено экспериментальное число 660.

**** β-Лактоглобулин взят в качестве стандарта с предположением 100% спиральности.

цима, пепсина, гистона и тропомиозина в воде значения соответственно равны 16—17, 38—57, 31—50, 46—58, 29—39, 26—31, 20—30 и 87—88%. В этиленхлоргидрине соответствующие значения 67, 45, 85, 75, 63, 44, 72 и 110%. С другой стороны, неясно, насколько справедливо термодинамическое рассмотрение нативных протеинов, в особенности тех, у которых много дисульфидных связей. Ковалентные поперечные связи и специфичные взаимодействия боковых цепей могут играть важную роль в сохранении нативной конфигурации как свернутых, так и развернутых сегментов цепей, особенно в таких скрученных молекулах, как рибону-

клеаза и серумальбумин, или в более однородно организованных молекулах типа кератина. Доказательства взаимодействия боковых цепей и их роли в молекулярной конфигурации будут рассмотрены в разделе 7.

Цифры в колонках 3 и 4 табл. 3 могут, следовательно, рассматриваться как нижний и верхний пределы для этого метода определения спиральности. Другие величины в табл. 3 достаточно хорошо согласуются между собой. К сожалению, нельзя сделать прямого сравнения с результатами рентгеновских и спектроскопических исследований в инфракрасной области, поскольку последние являются лишь качественными и не дают каких-либо количественных указаний на неспиральность или неупорядоченность образцов. Сравнение с результатами дейтероводородного обмена возможно лишь для рибонуклеазы и инсулина. В то время как совпадение данных, полученных двумя методами, достаточно удовлетворительно для инсулина, расхождение в случае рибонуклеазы, по-видимому, имеет место из-за предположения, что все медленно замещающиеся атомы водорода находятся в пептидной цепи и отсутствуют в боковых цепях.

б. *Спиральность белков и полипептидов.* В общем, лишь 15—50% аминокислотных остатков в нативных глобулярных белках в водном растворе находится в спиральной конфигурации. Это, по-видимому, меньше, чем в кристаллах белков. Процент спиральности может иногда увеличиваться, как в случае фиброина шелка, клюпена, нативной и окисленной рибонуклеазы, но не бычьего сывороточного альбумина, при добавлении LiBr^{58, 80, 168, 191}. Бромистый литий может давать эффект увеличения силы внутрицепных водородных связей в белках благодаря своему необычайно высокому коэффициенту активности. В концентрированных растворах он понижает активность воды и сводит к минимуму ее роль как разрушителя водородных связей. Этим можно было бы объяснить необыкновенную устойчивость сывороточного альбумина к тепловой денатурации в присутствии 7,7 М LiBr¹⁶⁸. Таблицы 2 и 3 также показывают, что у ряда протеинов спирализация может быть вызвана добавлением несольватирующих растворителей типа дихлорэтана или (лучше) этиленхлоргидрина.

С другой стороны, развертывание можно вызвать добавлением: а) высоких концентраций сильно сольватирующих или образующих водородные связи веществ типа мочевины, гуанидина, дихлоруксусной кислоты, муравьиной кислоты и (наиболее эффективный из органических растворителей) трифторуксусной кислоты; б) относительно низких концентраций анионов детергентов¹⁰¹, или в) повышением или понижением рН^{87, 137, 167, 174}. В этом случае электростатическое отталкивание вдоль цепей вызовет расширение и развертывание. Даже при рН 6—7 это происходит в клюпене^{87, 164} благодаря высокому содержанию основных аминокислот. Увеличение ионной силы может понизить отталкивание при низких рН либо за счет эффекта электростатического экранирования¹⁹², либо за счет специфического связывания анионов¹⁹³. Доти и другие⁵² смогли воспроизвести эффект низкого и высокого рН, мочевины, солей, этиленхлоргидрина и трифторуксусной кислоты, используя сополимер *l*-лизил-*l*-глутаминовой кислоты. Мочевина и кислота, по-видимому, вызывают такого же рода денатурационные изменения в яичном и сывороточном альбумине белка, поскольку они увеличивают левовращение и вязкость, тогда как молекулярный объем уменьшается¹⁹⁴. Однако, так как соль сильнее понижает вращение и вязкость, обусловленные действием кислоты, чем элиминирует уменьшение объема, Козман заключил, что концепция «переход спираль — клубок» является свехупрощением и что могут быть более чем два основных типа структур. Джиргенсонс^{167, 170, 195} и Эллиотт⁵⁶ пришли к тому же выводу, исходя из других соображений.

Влияние рН и температуры на спиральность протеинов качественно предсказывается теориями переходов спираль — клубок (разделы 3 и 4) и в последнее время демонстрируется на примере воднорастворимых ионизируемых полипептидов. Исследованием инфракрасных спектров поглощения, вязкости и оптического вращения поли-*l*-глутаминовой кислоты в смеси 0,2 М NaCl/диоксан (2 : 1) было показано¹¹², что эта поликислота существует в виде спирали в кислых растворах (рН 4), но имеет резкий переход к сольватированной неспиральной форме между рН 5,5 и 6,2 благодаря электростатическим отталкиваниям, и такая форма сохраняется вплоть до рН 12. Этот переход был подтвержден изучением инфракрасного дихроизма в твердых ориентированных пленках⁷⁹ натриевой соли полимера, где превалирует неспиральная форма, и исследованием в потоке растворов⁷⁹ неионизированной кислоты в смеси диоксан — тяжелая вода, где имеет место спиральная форма. Температурная зависимость $[\alpha]_D$ при рН 5,5—6,2 аналогична полученной в случае денатурации протеинов: более высокие температуры способствуют денатурации, хотя в данном случае переход отчасти более размыт благодаря низкому молекулярному весу (34 000) и полидисперсности образца¹¹².

В случае поли-*l*-лизина⁵³ действие рН прямо противоположно. Ниже рН 10 высокий положительный заряд предотвращает образование спиральной формы, будет ли молекулярный вес низким (меньше 100 000) или высоким (больше 100 000). Выше рН 10 левовращение увеличивается, и дисперсия становится аномальной, однако величина b_0 и инфракрасные спектры поглощения показывают, что конфигурация зависит от длины цепи. Низкомолекулярные образцы, по-видимому, находятся в β -состоянии, так как $b_0 = -275$, имеется полоса поглощения с частотой 1610 см^{-1} , и полимер агрегирован. Высокомолекулярные образцы, вероятно, α -спиральны, поскольку $b_0 = -650$, и полоса поглощения 1610 см^{-1} исчезает.

Доти и другие^{52, 196} получили также амфотерные полипептиды, содержащие эквимольные количества *l*-лизина и *l*-глутаминовой кислоты с молекулярным весом порядка 40 000, и показали, что в 0,15 М водном растворе NaCl спиральность сополимера не больше 50% при рН 1—4, падает до 15% при рН 7 и равна нулю при рН 12. Отсутствие симметрии в области нейтральности согласуется с более ранними наблюдениями^{53, 112}, что спирали поли-*l*-лизина менее стабильны, чем спирали поли-*l*-глутаминовой кислоты и не выдерживают высоких плотностей зарядов.

В начале раздела 6, Б было сделано указание на большое количество данных по конфигурационным изменениям, имеющим место в кислых и щелочных растворах протеинов. В последнее время усиливается интерес к свойствам связывания ионов бычьим альбумином плазмы^{197, 199} и, в особенности, к явлению расширения, сопровождающего связывание водородных ионов. Кривые титрования^{200, 201}, измерения вязкости^{202—204} и другие данные^{205—208} говорят за то, что имеет место набухание, однако механизм, по всей вероятности, более сложный, чем предполагаемое простое взаимное отталкивание заряженных групп. Связывание водородных ионов само по себе может также изменять структуру в результате разрушения водородных связей^{105, 203, 207—210} и нарушить третичную, равно как и вторичную структуру^{105, 203, 207—210} (см. раздел 7, б).

в. *Фибриллярные белки и содержание пролина*. Фибриллярные белки, которые дают рентгенограммы α -типа, все, кроме фибриногена, обнаруживают аномальную вращательную дисперсию в водных растворах в нативном состоянии и обладают спиральностью 45—94%^{183, 184}. Очень большие отрицательные значения $[\alpha]_D$ (от -103 до -118°) говорят за то, что все подобные протеины, кроме парамиозина, полностью денатурируют в 9,5 М растворе мочевины. В этом состоянии дисперсия проста,

и λ_c равно 212—218 $m\mu$. Оптическое вращение²¹¹ и другие физические свойства^{219, 214} тропомиозина моллюска *Ripha* в растворе показали, что этот белок является образцом совершенной стержнеобразной α -спирали и, следовательно, идеальным стандартным белком для дальнейших исследований.

Высокая спиральность фибриллярных белков по сравнению с глобулярными и их конфигурационная приспособляемость объясняются, вероятно, малым содержанием в некоторых из них дисульфидных связей и пролина. Сцент-Дьёрди и Коэн¹⁸⁴ указали на четкую обратную пропорциональную зависимость между спиральностью и содержанием пролина для семи фибриллярных белков. В общем, глобулярные белки богаче пролином, чем фибриллярные, за исключением инсулина, авидина и лизоцима, где, однако, дисульфидные или фосфатные поперечные связи, вероятно, препятствуют полной спирализации. Неспособность пролина включаться в α -спираль^{19, 189} вызывает нарушение спирали, поэтому некоторые сегменты спирали могут оказаться слишком короткими, чтобы существовать в воде без дополнительной стабилизации. Когда содержание пролина достигает 8% по весу, никакая цепь любой длины не сможет существовать в виде стабильной спирали в водном растворе. Казеин¹⁶⁷ принадлежит к этой категории белков с $[\alpha]_D = -100^\circ$ и значением λ_c около 220 $m\mu$. Очень высокое содержание пролина может привести к совершенно другому типу спирали. Необычно высокое отрицательное вращение нативного коллагена (-350°), вероятно, обусловлено не высоким вращением пролиновых и оксипролиновых остатков или компенсацией спиралей противоположных направлений¹⁴⁰, а скорее присутствием, по крайней мере частично, спирали полипролинового типа. Это могло бы объяснить также упоминавшийся выше факт, что тогда как желатина, по-видимому, в растворе находится в виде беспорядочной цепи, под влиянием LiBr происходит не усиление водородных связей, а ускоряется *транс-цис*-изомеризация пролин-пролиновых пептидных связей. Это подтверждается также тем обстоятельством, что увеличение λ_c не сопровождается увеличением вязкости¹⁷⁶. Структура поли-*l*-пролинов, для которых невозможны никакие пептидные водородные связи, поскольку пролин является иминокислотой, недавно была определена при помощи дифракции рентгеновских лучей²¹⁵ и вращательной дисперсии^{157, 158, 216}. По-видимому, имеется две спиральные формы с противоположным направлением вращения спирали, которые взаимопревращаются в твердом состоянии и в растворе. Более изученный полипролин II с удельным вращением -540° находится в водных растворах в виде левой спирали²¹⁵ с тремя остатками на виток и пептидными связями в *транс*-конфигурации. Полипролин I обладает удельным вращением $+40^\circ$, и измерения вращательной дисперсии, вязкости и седиментации говорят за то, что он находится в виде правых спиралей, с пептидными связями в *цис*-конфигурации¹⁵⁸. Интересно, что значения, полученные для полипролина II, совместимы со значениями, рассчитанными по теории Фитса и Кирквуда^{150, 151}. Эти полипептидные системы будут несомненно играть большую роль при интерпретации поведения таких белков, как коллаген, желатина, казеин и зеин.

В заключение необходимо обратить внимание на то, что оценка спиральности (см. табл. 3) производится лишь весьма приблизительно. Теоретические основы таких определений спиральности появились совсем недавно и находятся в стадии разработки. До сих пор только уравнение Моффитта испытано довольно хорошо и, хотя эмпирически оно весьма полезно, теория обладает серьезными недостатками. Дальнейшее важное развитие теории можно ожидать, используя формулы Кирквуда для полимеров α -спиралей, так как эти формулы должны быть более широко применимы¹⁹⁰.

7. ТРЕТИЧНАЯ СТРУКТУРА БЕЛКОВ

Здесь удобно ввести номенклатуру, предложенную Линдерстрем-Лангом²¹⁷ и расширенную Берналом²¹⁸ (см. рис. 5). Первичной структурой является последовательность аминокислот в индивидуальной полипептидной цепи. Благодаря взаимодействиям между различными сегментами одной цепи, эта цепь может быть свернута во вторичные структуры типа различных спиралей. Спирали могут затем соединяться бо-

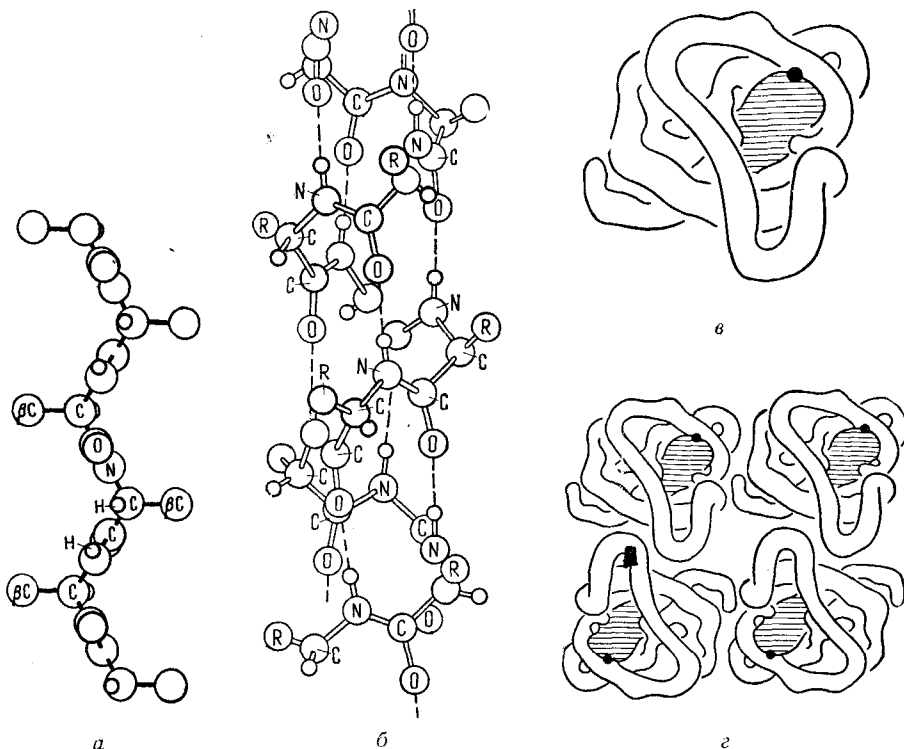


Рис. 5. Уровни молекулярной организации в протеинах по Линдерстрем-Лангу²⁷¹ и Берналу²¹⁸: а — первичная, б — вторичная, в — третичная, г — четвертичная структуры

ковыми поверхностями или «конец к концу» и удерживаться таким образом в третичной структуре ковалентными связями типа дисульфидных мостиков или менее стабильными взаимодействиями между боковыми цепями типа водородных связей, ван-дер-ваальсовых связей, солевых мостиков и «гидрофобных» связей (см. раздел 7, В). Агрегация таких макромолекул ведет к образованию четвертичной структуры, которая, как полагают, имеет место в кристаллах гемоглобина и вирусов или в растворах таких агрегирующих протеинов, как инсулин и казеины. Простейшая модель процесса агрегации рассмотрена Полингом²¹⁹.

Мы уже видели, что полипептидные цепи могут принимать разные конфигурации с различной степенью упорядоченности в зависимости от изменений температуры, растворителя и т. д. Было также очевидно, что легкость адаптации молекулы в соответствующей среде в значительной степени зависит от взаимодействия между боковыми цепями. Сильные ковалентные связи, включая дисульфидные или фосфатные^{220–222}, могут стабилизировать существующие структуры таким образом, что конфигурационное изменение будет ограниченным или даже невозможным. Действие ван-дер-ваальсовых сил, водородных связей и, возможно, диполь-дипольных взаимодействий²²³ довольно трудно предсказать.

В случае смены растворителя один тип взаимодействий боковых цепей может быть заменен на другой, и относительная устойчивость конфигурации полипептидной цепи в двух состояниях будет зависеть от старой и новой системы связей.

Прежде считали^{8, 27, 224}, что биологическая специфичность протеинов имеет место в основном благодаря взаимодействиям между боковыми цепями. Однако лишь недавно были сделаны попытки оценить роль этих третичных сил в осуществлении наиболее вероятной конфигурации белков. В основном методика сводилась к селективному разрушению существующих интермолекулярных связей в нативном белке и изучению влияния этого разрушения на молекулярную конфигурацию. Методы оценки конфигурационных изменений в растворе уже рассмотрены в разделах 5 и 6. Однако методы, используемые в настоящее время для исключения «скрепляющего» действия дисульфидных связей, недостаточно тонки для гарантии того, что молекулярная конфигурация протеина не нарушается каким-либо другим образом. С другой стороны, методы локализации и идентификации гидрофобных и водородных связей еще малочисленны. Сведения о дисульфидных связях будут рассматриваться в первую очередь.

А. Дисульфидные связи

Наличие дисульфидных связей является наиболее характерным обстоятельством существования третичной структуры во многих белках, и, по всей вероятности, эти связи обладают наибольшим влиянием на конфигурацию. Как известно, такие связи существуют как между молекулами, так и в пределах одной молекулы. Поскольку α -спираль является прямой и жесткой структурой, ее можно изогнуть лишь при частичном нарушении спирали в месте перегиба. Область перегиба может содержать остаток пролина или короткий неупорядоченный участок цепи. По-видимому, внутримолекулярные связи в большей мере нарушают спиральную конфигурацию, чем межмолекулярные связи. Этот эффект может быть прослежен на рибонуклеазе, которая имеет четыре внутримолекулярные дисульфидные связи в одной полипептидной цепи, и соответственно обладает низкой спиральностью (см. табл. 1 и 3). С другой стороны, кератин шерсти даже с большим числом дисульфидных связей, по-видимому, более упорядочен²²⁵, причем 50% протеина находится в виде длинных регулярно расположенных сегментов цепей. При этом, дисульфидные связи представлены главным образом как межмолекулярные, а не внутримолекулярные связи. Инсулин, обладающий как внутри, так и межмолекулярными дисульфидными связями, по свойствам находится между рибонуклеазой и кератином. Окситоцин с одной дисульфидной связью при молекулярном весе лишь 1007 обнаруживает неожиданное нарушение спирали в 7 М мочеvine при pH 8, причем левовращение увеличивается от -23 до -90° ²²⁶. Очевидно, число дисульфидных связей не так существенно, как их расположение при определении возможной спиральности. На это обращали внимание еще Маркус и Каруш¹⁶⁹, которые обнаружили неожиданно высокую гибкость и конфигурационную приспособляемость бычьего сывороточного альбумина, который обрабатывался красителями, вызывающими структурные изменения.

Не всегда возможно предсказывать конфигурацию после нарушения дисульфидных связей. Это будет зависеть от первоначальной конфигурации и даже больше от растворителя, в котором исследуется изменение конфигурации. Изменение удельного вращения, которое обычно связывается с разрывом дисульфидных связей, Тёрнер, Ботл и Гауровиц^{227, 228} приписывают снятию напряжения в остатках цистина²²⁹, нежели конфигурационным изменениям главной цепи.

Это соображение основывается на том, что окисление цистина до цистеиновой кислоты изменяет $[\alpha]_D$ от -285° до $+5,5^\circ$, и переход дисульфидных групп протеина в соответствующие производные сульфоновой кислоты приводит к изменению удельного вращения, которое увеличивается с содержанием дисульфидных групп. Изменение удельного вращения, измеренное в 80% уксусной кислоты, следующее:

Бычий серумальбумин (17 дисульфидных групп, $M=69000$)...	+ 22,5°
Овзльбумин (1 дисульфидная группа, $M=46000$)	+ 4,9°
Эдестин (2 дисульфидные группы, $M=50000$)	+ 6,4°
Лизоцим (5 дисульфидных групп, $M=14800$)	+ 15,6°

Кроме того, для серумальбумина и лизоцима изменения удельного вращения были того же порядка, что и рассчитанного для превращения цистина в цистеиновую кислоту.

Если, как считают Тёрнер и другие, меньшее отрицательное значение удельного вращения является лишь следствием исчезновения ненормального большого отрицательного вращения остатков цистина, то должно иметь место аналогичное явление, когда эти остатки превращаются в другие производные с меньшей вращательной способностью. Харрап и Вудс²³⁰ нашли, что на самом деле этого нет*. Полное восстановление бычьего сывороточного альбумина, сопровождаемое реакцией SH-групп с иодуксусной кислотой, дает S-карбоксиметил-серумальбумин с вращательной способностью (-87°), мало отличающейся от первоначального белка (-83°) в 99% муравьиной кислоте. Однако превращение самого цистина в S-карбоксиметил-цистеин дает изменение вращения в положительную сторону примерно на 260° . Харрап и Вудс заключают, что должны иметь место важные структурные изменения в результате восстановления дисульфидных связей и алкилирования. Поскольку $[\alpha]_D$ измерялось в сильно сольватированных системах, изменение удельного вращения было бы противоположно по знаку тому, которое должно быть в результате перехода цистин — S-карбоксиметилцистеин, и, по-видимому, одно погашало бы другое. Это исследование указывает на важность выбора растворителей для определения направления изменения $[\alpha]_D$ при разрушении дисульфидных связей. Этим можно объяснить расхождение между результатами Тернера и других^{227, 228}, которые измеряли вращение окисленного серумальбумина в присутствии 20% воды, и данными Янга и Доти⁸¹, использовавшими смесь дихлорэтан — дихлоруксусная кислота и обнаружившими очень малое изменение удельного вращения при окислении. Изменения, происходящие в воде, могут идти в любом направлении в зависимости от способности нативной и окисленной форм противостоять слабым разупорядочивающим действиям воды. Окисление сывороточного альбумина человека было изучено также Джиргенсонсом и Икенакой²³², которые нашли, что получающийся продукт обладал гидродинамическими свойствами линейного полиэлектролита и той же дисперсией оптического вращения, что и денатурированный исходный белок. Единичная цепь²³³ или группа цепей²³⁴, получающихся при окислении, по-видимому, обладают большей конфигурационной приспособляемостью и аналогично фиброину шелка⁸¹, α -АКТГ¹³² и растворимым белкам шерсти²³⁵, которые лишены ковалентных поперечных связей, могут более легко реагировать на изменение растворителя.

Подобные рассуждения применимы к рибонуклеазе и инсулину. Некоторые предварительные эксперименты с рибонуклеазой⁸¹ показали, что удаление конфигурационных ограничений, обусловленных дисульфидными связями, не влияло на образование спирали, однако потом было показано^{158, 171}, что окисленный фермент сильнее деспирализуется

* Каруш²³¹ обнаружил изменения $[\alpha]_D$, соответствующие природе блокирующего реагента.

в воде, и его оптическое вращение аналогично вращению денатурированных ферментов. Харрингтон и Шеллман¹⁷¹ указали на стабилизирующий эффект поперечных связей в нативных структурах и предложили способ термодинамического рассмотрения этого эффекта в теории денатурации белков с позиций модели «перехода спираль — клубок». Другие измерения на окисленной рибонуклеазе и окисленной А-цепи инсулина в воде^{87, 164} относят эти белки к категории «денатурированных» со значениями λ_c в пределах 201—230 м μ и $[\alpha]_D$ примерно от -67° до -112° . В противоположность нативным белкам, в случае вышеупомянутых «денатурированных» белков рН или мочевины не влияют на λ_c и $[\alpha]_D$ имеет небольшой отрицательный температурный коэффициент⁸⁷. Мы видели, однако, что можно вызвать свертывание окисленной рибонуклеазы в присутствии LiBr, а также превратить окисленную В-цепь инсулина в спиральную форму растворением в диметилформамиде⁸¹. Это контрастирует с поведением интактного инсулина, где, по-видимому, лишь 15—45% остатков подвержены переходу спираль — клубок в результате изменения рН или растворителя⁸¹. Исследование Аридта и Райли⁸⁹ подтверждает, что дисульфидные связи инсулина удерживают α -конфигурацию.

Во всех этих исследованиях по разрушению дисульфидных связей при помощи окисления и восстановления обычно выделялись продукты реакции специально для изучения физико-химических характеристик. Окисление хорошо идет в 99% муравьиной кислоте, а восстановление — в 8 М мочевины (если необходимо реакцию довести до конца). Обе эти реакции и последующая изоляция продуктов идут в достаточно жестких условиях и могут также вызывать необратимые изменения конфигурации, которые не имеют никакого отношения к разрыву дисульфидных связей. Шеллман (⁸⁷, стр. 422) проследил изменения $[\alpha]_D$ после обработки водных растворов инсулина при рН 7,5 и 2,1 тиогликолевой (меркаптоуксусной) кислотой. Вращение менялось от -30 до $-80,5^\circ$, соответственно, причем максимальное изменение было -88° при рН 5,5 в присутствии 9 М мочевины. Теперь имеется два новых метода для специфического и полного раскрытия дисульфидных связей в водных растворах при рН 6—11. Обе реакции могут быть проведены в отсутствие мочевины и с удобной скоростью (от нескольких минут до 48 часов) и могут успешно применяться в структурных исследованиях, о которых упоминалось выше. В одном случае S—S связь превращается в SSO₃ группу в присутствии сульфата натрия с одним эквивалентом меди^{236, 237} или с воздухом и следами меди в качестве катализаторов^{85, 66}. В другом случае²³⁸ разрыв дисульфидной связи асимметричен, и S—S связь превращается в SSO₃⁻ и SHgR-группы соответственно. Скорости обеих реакций можно проследить простейшими аналитическими методами²³⁹.

Структурные исследования продуктов полного восстановления белков обычно усложняются сильной тенденцией этих продуктов к агрегации в растворе^{73, 231, 240—244}. Силы, обуславливающие агрегацию, еще недостаточно изучены, однако, оценивая величины сил электростатического отталкивания, которые нужны для предотвращения агрегации, можно видеть, что они должны быть значительными и, вероятно, состоять, хотя бы частично, из водородных и гидрофобных связей²⁴⁵. Роль таких сил в определении конфигурации белков будет рассматриваться ниже.

Б. Водородные связи между боковыми цепями

Существуют различные убедительные доказательства существования водородных связей между боковыми цепями в белках. Во-первых, молекула белка может обнаруживать высокую конфигурационную стабильность даже в случае отсутствия ковалентных поперечных связей между петлями цепи. Подходящим примером является миоглобин, кото-

рый состоит из одной цепи без ковалентных поперечных связей, однако молекула удерживается в очень сложном свернутом состоянии (см. рис. 1). Этот факт, наряду с расстоянием между цепями (8—10 Å) явно подтверждает, что взаимодействие между боковыми цепями действительно имеет место, и при отсутствии других доказательств, по-видимому, можно заключить, что лишь благодаря этим взаимодействиям достигается уникальная форма свертывания цепи *. Другим интересным случаем является гемоглобин лошади, который обладает 6 N-концевыми группами на молекулу²⁴⁷, однако опять же без ковалентных поперечных связей. Ниже pH 4 наблюдается заметное изменение вязкости, которое указывает на увеличение радиуса молекулы от 26,5 до 41,5 Å²⁴⁸, такое набухание связано с освобождением 36 кислотных и основных групп, которые не титровались в нативной молекуле²⁴⁹. Кислотная денатурация ферригемоглобина²⁵⁰ и овомукоидов²⁵¹ также освобождает карбоксильные и имидазольные группы. Водородные связи между COOH-группами в димерах уксусной кислоты хорошо известны, и аналогичные силы могут быть ответственны за стабильность нативного гемоглобина и недоступность некоторых ионизируемых групп. В этом случае, а также и в других, о которых следует упомянуть, концентрированный раствор мочевины раздвигает субъединицы²⁵², и это дает дополнительное доказательство, что разрываются водородные связи.

Водородные связи между боковыми цепями определяют физические и химические свойства фибрина шелка и коллагена, в которых дисульфидные связи отсутствуют. Другое доказательство взаимодействия такого типа мы получаем при исследовании синтетических полипептидов, в которых существуют боковые цепи лишь одного или двух сортов и где цепи существуют раздельно. Мы уже видели, что поли-*l*-глутаминовая кислота обладает неожиданно высокой устойчивостью в спиральной неионизированной форме, и это отражается на сополимере *l*-лизил-*l*-глутаминовой кислоты, где зависимость устойчивости спирали от pH несимметрична относительно изоэлектрической точки^{52, 112, 196}. Доти и другие приписывают это —COOH...HOOC-взаимодействию вдоль цепи, которое препятствует переходу в неупорядоченную форму.

Кроме этих доказательств, имеется большое количество данных о необычно низкой степени связывания ионов или красителей определенными боковыми цепями, несущими кислотные, основные или —SH-группы. Это обычно приписывают стерическим факторам²⁵³. Однако убедительные данные заставляют предполагать^{201, 254–258}, что малые ионы могут входить в молекулу белка и что полярные боковые цепи с низкой связывающей способностью, по-видимому, закрыты в водородных связях.

Теоретически все полярные боковые цепи белков способны связываться друг с другом водородными связями. Однако мы ограничимся в данном обзоре рассмотрением только таких водородных связей, которые благодаря своей устойчивости и постоянству поддаются экспериментальному изучению. Геометрия молекулы белка в упорядоченном его состоянии налагает некоторые ограничения на число таких взаимодействий. Модель показывает, что при фиксации одного взаимодействия число остающихся возможностей оказывается неожиданно малым, так что локализация и идентификация донорных и акцепторных групп не так уж безнадежна, как может показаться с первого взгляда. Либо тот, либо другой из двух взаимодействующих партнеров должен быть ионизируемым или нести хромофор, чтобы взаимодействие могло быть обнаружено непосредственно при изменении прочности водородных связей или изменении соответствующих характеристик спектров поглощения. Однако

* Смит²⁴⁶ недавно сделал предположение, что лабильные тиоловоэфирные, ацилимидазольные и ацилфенольные связи могут также поддерживать третичное свертывание протеинов.

имеется косвенный путь обнаружения взаимодействия таких групп, как серин, треонин, глутамин, аспарагин и т. д. через влияние таких связей на термодинамику разрыва первичных валентных связей типа дисульфидных или пептидных связей¹⁰⁷. Если мы еще знаем последовательность аминокислотных остатков в протеине, то возникает возможность идентификации тех или иных взаимодействующих групп, а также возможность получения важных сведений о конфигурации цепи между такими группами.

В. Гидрофобные или неполярные связи

Эти связи возникают в результате тесного сближения двух или более жирных групп с целью понижения общей поверхности контактирования с водой. На деле, таким образом, система как целое выигрывает в энергии образования некоторых $\text{H}_2\text{O} \cdots \text{H}_2\text{O}$ водородных связей, и эта величина может быть очень большой. С другой стороны, такие гидрофобные связи, однажды образованные, трудно разрушить, так как отдельные молекулы воды должны быть разделены, чтобы «смочить» разделяемые группы. Большинство доказательств существования гидрофобных связей не являются прямыми, и поскольку так мало известно о стереохимии или термодинамических свойствах этих связей, невозможно их учесть в модели белка. Козман¹⁰¹ проводит различие между ван-дер-ваальсовскими связями и гидрофобными, отмечая, что ван-дер-ваальсовские силы вносят лишь небольшую долю в общую энергию гидрофобной связи.

На основе своей работы по устойчивости спирали поли-*dl*-аланина Бергер и Линдерстрём-Ланг¹²⁹ определили приближенную величину энергии лишь в 2,0 ккал на связь и, учитывая стерические условия, они предположили, что большая часть этой энергии, если не вся, будет сохраняться скорее в тепловом, чем в энтропийном члене. Эта величина много меньше, чем можно было ожидать⁶⁸. Интересно, что в этом случае мочевины не оказывает никакого влияния на спиральность, исключая водородную связь как стабилизирующий фактор. Значительная стабильность спиральной формы наблюдалась также для поли-*l*-аланина и поли-*l*-лейцина^{57, 180}. Имеются определенные доказательства спирализации даже в дихлоруксусной кислоте. Для получения полностью беспорядочной формы необходима трифторуксусная кислота. Для полимеров, состоящих исключительно из *l*-остатков, внутримолекулярные гидрофобные связи, по-видимому, невозможны по стерическим соображениям. Было бы интересно знать, будут ли такие полимеры агрегироваться, например, в муравьиной или дихлоруксусной кислоте и будет ли, следовательно, стабильность спиралей обусловлена межмолекулярным взаимодействием неполярных связей боковых цепей, или нет.

Можно ввести жирные боковые цепи в протеин, который содержит дисульфидные связи, путем восстановления с последующим алкилированием образующихся —SH-групп. В таких случаях удельное вращение продуктов реакции может быть связано с «гидрофобностью» блокирующих реагентов²³¹.

Влияние органических растворителей типа этанола на денатурацию белка²⁵⁹ или превращение фибрина шелка в нерастворимую форму¹⁶⁸ может быть приписано нарушению гидрофобных взаимодействий, которые существенны для поддержания спиральной конфигурации. Действие детергентов объясняется с той же точки зрения: малые количества предохраняют белки от денатурации теплом и мочевиной, вероятно, стабилизируя «внутримолекулярные мицеллы» в результате адсорбции на них^{260, 261}. Большие количества вызывают денатурацию, вероятно, из-за «насыщения» жирных боковых цепей и разворачивания и (или) диссоциации с соответствующим нарушением других видов третичных связей^{96, 262}.

8. ВЫВОДЫ

Этот обзор конфигурации белков является неполным во многих отношениях. В обзоре рассматривалось, например, явление денатурации лишь в той мере, в какой это касалось первоначального процесса разупорядочения. Однако выяснилось, что различие между белками в их отношении к денатурирующим условиям сильно зависит от распределения их третичных связей. Те же самые факторы должны иметь решающее значение и в определении нативной конфигурации и биологической специфичности. Попытки ввести взаимодействия боковых цепей в термодинамическую теорию денатурации протеинов находятся в зачаточном состоянии²⁶³. В добавление к первичному денатурационному процессу имеет место последующая агрегация (или дезагрегация), которая мало изучена (см. например^{101, 217, 264, 265}). Мы лишь коснулись явления агрегации. Агрегация и молекулярная конфигурация, по-видимому, взаимозависимы²⁶⁶ и зависят, в свою очередь, от длины цепи. Например, из теоретических соображений мы должны ожидать, что при агрегации нескольких длинных цепей образовались бы спирали, тогда как агрегация большого числа малых цепей приводила бы к образованию слоев⁸⁶. Отчасти стабильность частично свернутой структуры инсулина и его изолированной В-цепи в растворе⁸³ может быть обусловлена агрегацией. Поли-*l*-лизин также может существовать в разных конфигурациях и состояниях агрегации⁵³ в зависимости от молекулярного веса.

Полное выявление конфигурации молекулы миоглобина Кендрию с сотрудниками можно считать стимулом для будущих исследований. Мы можем также ожидать, что аналогичная работа в Калифорнийском технологическом институте приведет к установлению полной структуры лизоцима. Со временем это обусловит развитие теории оптического вращения и совместно с другими физическими измерениями даст нам возможность выяснить, как много вторичных и третичных структур, обнаруженных в кристаллах, остается в водных растворах и в какой степени они зависят от растворителя. Точные измерения скоростей замещения дейтерием и тритием (и, возможно, применение методов магнитного резонанса) может дать связь с третичной структурой посредством определения количества быстро замещающихся водородных атомов, участвующих в соответствующей функции. Более детальное описание системы третичных связей будет развито из интерпретации дифференциальных спектров не только в области 250—310 $m\mu$, но и в области ниже 250 $m\mu$ ²⁶⁷. Мы можем также ожидать успешного применения спектров Рамана²⁶⁸.

В настоящее время мы не можем сколько-нибудь точно оценить влияние гидрофобных или даже водородных связей на третичную структуру, поскольку у нас очень мало количественных данных по термодинамическим величинам, имеющим отношение к этим связям. Мы крайне нуждаемся в такого сорта информации, получаемой от специально подобранных подходящих реальных моделей, в частности, пептидов. Перед тем, как мы сможем объяснить данные кривых титрования кислотой и другими ионами, потребуются более точные фундаментальные данные о чистом заряде молекулы белка и о связывании малых ионов. Сейчас мы можем, по крайней мере, ставить проблемы и выявлять недостатки. Конечная цель стоит потраченных трудов; секреты биологической активности скрыты в конфигурации белков.

ЛИТЕРАТУРА

1. W. T. Astbury, A. Street, Trans. Roy. Soc., A230, 75 (1931).
2. W. T. Astbury, H. J. Woods, Там же, A232, 333 (1933).
3. W. T. Astbury, Trans. Faraday Soc., 34, 377 (1938).
4. W. T. Astbury, J. Internat. Soc. Leather Trades 'Chemists, 24, 69 (1940).

5. W. T. Astbury, S. Dickinson, *Proc. Roy. Soc.*, **B129**, 307 (1940).
6. W. T. Astbury, *J. Text.-Inst.*, **44**, P81 (1953).
7. Б. Лой, в сб. Белки, под ред. Г. Нейрата и К. Бэйли, ИЛ, 1956, т. 2, § 4.
8. H. Neurath, J. P. Greenstein, F. W. Putnam, J. O. Erickson, *Chem. Revs.*, **34**, 157 (1944).
9. F. Sanger, в сб. *Currents in Biochemical Research*, под ред. D. E. Green, Interscience, N. Y. and London, 1956, стр. 434.
10. П. Портер, см.⁷ ИЛ, 1958, т. 3, ч. 1, стр. 7.
11. L. Pauling, R. B. Corey, *J. Am. Chem. Soc.*, **72**, 5349 (1950).
12. M. L. Huggins, *Chem. Revs.*, **32**, 211 (1943).
13. B. W. Low, R. B. Baybutt, *J. Am. Chem. Soc.*, **74**, 5806 (1952).
14. B. W. Low, H. J. Grenville-Wells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, **39**, 785 (1953).
15. L. Pauling, R. B. Corey, H. R. Branson, Там же, **37**, 205 (1951) и след.
16. R. B. Corey, L. Pauling, *Proc. Roy. Soc.*, **B141**, 10, 21 (1953).
17. F. H. C. Crick, *Science Progr.*, **166**, 205 (1954).
18. E. J. Ambrose, A. Elliott, *Proc. Roy. Soc.*, **A205**, 47 (1951).
19. B. W. Low, J. T. Edsall, см.⁹, стр. 378.
20. F. H. C. Crick, J. C. Kendrew, *Advances in Protein Chem.*, **12**, 133 (1957).
21. L. Pauling, R. B. Corey, *Nature*, **171**, 59 (1953).
22. F. H. C. Crick, Там же, **170**, 882 (1952).
23. M. L. Huggins, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, **43**, 204 (1957).
24. A. R. Lang, *Acta Cryst.*, **9**, 436, 446 (1956).
25. R. D. B. Fraser, T. P. McCrae, D. H. Simmonds, *Biochim. Biophys. Acta*, **25**, 654 (1957).
26. F. H. Westheimer, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, **43**, 969 (1957).
27. S. J. Leach, *Advances in Enzymol.*, **15**, 1 (1954).
28. G. Karreman, R. H. Steele, A. Szent-Gyorgyi, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, **44**, 140 (1958).
29. H. R. Mahler, см.⁹, стр. 251.
30. K. Linderström-Lang, Special Publication № 2, *Chem. Soc. (London)*, **1955**, 1.
31. H. Lindley, J. S. Rollett, *Biochim. et Biophys. Acta*, **18**, 183 (1955).
32. A. Ehrenberg, H. Theorell, *Nature*, **176**, 158 (1955).
33. J. C. Kendrew, G. Bodo, H. M. Dintzis, R. C. Parrish, H. Wyckoff, Там же, **181**, 662 (1958).
34. F. H. C. Crick, *Acta Cryst.*, **5**, 381 (1952).
35. W. L. Bragg, E. R. Howells, M. F. Perutz, Там же, **5**, 136 (1952).
36. A. Elliott, *Proc. Roy. Soc.*, **A211**, 490 (1952).
37. Б. Блоу, см.⁷.
38. J. C. Kendrew, *Progr. in Biophys. and Biophys. Chem.*, **4**, 244 (1954).
39. V. W. Arndt, D. P. Riley, *Trans. Roy. Soc.*, **A247**, 409 (1955).
40. J. C. Kendrew, *Nature*, **182**, 764 (1958).
41. M. M. Bluhm, G. Bodo, H. M. Dintzis, J. C. Kendrew, *Proc. Roy. Soc.*, **A246**, 369 (1958).
42. D. W. Green, V. M. Ingram, M. F. Perutz, *Proc. Roy. Soc.*, **A225**, 287 (1954).
43. J. C. Kendrew, *New Scientist*, **3**, 9 (1958).
44. J. C. Kendrew, R. E. Dickerson, B. E. Strandberg, R. G. Hart, D. R. Davies, *Nature*, **185**, 422 (1960).
45. M. F. Perutz, M. G. Rossmann, A. F. Cullis, H. Muirhead, G. Will, A. C. T. North, Там же, **185**, 416 (1960).
46. J. C. Kendrew, H. C. Watson, B. E. Strandberg, R. E. Dickerson, D. C. Phillips, V. C. Shore, Там же, **190**, 666 (1961).
47. Дж. Кендрью, Материалы V Международного биохимического конгресса.
48. A. Elliott, *Proc. Third Internat. Congr. Biochem.*, Acad. Press, N. Y., 1956.
49. R. D. B. Fraser, *Nature*, **170**, 491 (1952).
50. S. Krimm, *J. Chem. Phys.*, **24**, 491 (1955).
51. R. D. B. Fraser, W. C. Price, *Nature*, **170**, 490 (1952).
52. P. Doty, K. Imahori, E. Klemperer, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, **44**, 424 (1958).
53. J. Applequist, P. Doty, Abstr. 133rd Meeting Am. Chem. Soc., San Francisco, 32Q, April 1958.
54. P. Doty, A. M. Holtzer, J. H. Bradbury, E. R. Blout, *J. Am. Chem. Soc.*, **76**, 4493 (1954).
55. A. Elliott, W. E. Hanby, B. R. Malcolm, *Nature*, **180**, 1340 (1957).
56. A. Elliott, W. E. Hanby, B. R. Malcolm, *Disc. Faraday Soc.*, **25**, 167 (1958).
57. E. J. Ambrose, C. H. Bamford, A. Elliott, W. E. Hanby, *Nature*, **167**, 264 (1951).
58. C. H. Bamford, A. Elliott, W. R. Hanby, *Synthetic Polypeptides*, Academic Press, N. Y., 1956.
59. E. R. Blout, H. Lenormant, *Nature*, **178**, 960 (1957).
60. M. Beer, G. B. M. Sutherland, K. N. Janner, D. L. Woods, *Proc. Roy. Soc.*, **A249**, 147 (1959).

61. E. M. Bradbury, R. E. Burge, J. T. Randall, G. R. Wilkinson, *Disc. Faraday Soc.*, **27**, 173 (1958).
62. G. N. Ramachandran, *Nature*, **177**, 710 (1956).
63. J. R. Kimmel, E. L. Smith, *Advances in Enzymol.*, **19**, 267 (1957).
64. M. Sela, C. B. Anfinsen, W. F. Harrington, *Biochim. et Biophys. Acta*, **26**, 502 (1957).
65. R. E. Richards, H. W. Thompson, *J. Chem. Soc.*, **1947**, 1248.
66. C. Tanford, J. Epstein, *J. Am. Chem. Soc.*, **76**, 2163, 2170 (1954).
67. C. Robinson, *Trans. Faraday Soc.*, **52**, 571 (1956).
68. C. Robinson, J. C. Ward, R. B. Beevers, *Disc. Faraday Soc.*, **25**, 29 (1958).
69. D. P. Riley, D. Herbert, *Biochim. et Biophys. Acta*, **4**, 374 (1950).
70. D. P. Riley, G. Oster, *Disc. Faraday Soc.*, **4**, 107 (1951).
71. G. Oster, D. P. Riley, *Acta Cryst.*, **5**, 1 (1952).
72. W. Kauzmann, *Ann. Rev. Phys. Chem.*, **8**, 413 (1957).
73. H. Lenormant, J. Boistel, *J. physiol. (Paris)*, **42**, 640 (1950).
74. C. H. Bamford, W. E. Hanby, F. Happey, *Proc. Roy. Soc.*, **A205**, 30 (1950).
75. C. H. Bamford, W. E. Hanby, F. Happey, *Там же*, **A206**, 407 (1951).
76. C. H. Bamford, L. Brown, A. Elliott, W. E. Hanby, I. F. Trotter, *Nature*, **171**, 1149 (1953).
77. C. H. Bamford, L. Brown, A. Elliott, W. E. Hanby, I. F. Trotter, *Там же*, **173**, 27 (1954).
78. A. Elliott, *Proc. Roy. Soc.*, **A226**, 408 (1954).
79. E. R. Blout, M. Idelson, *J. Am. Chem. Soc.*, **78**, 497 (1956).
80. M. Idelson, E. R. Blout, *Там же*, **80**, 4631 (1958).
81. J. T. Yang, P. Doty, *Там же*, **79**, 761 (1957).
82. A. Elliott, *Nature*, **170**, 1056 (1952).
83. S. J. Leach, H. A. Scheraga, *Compt. rend. trav. lab. Carlsberg, Sér. chim.*, **30**, 271 (1958).
84. S. J. Leach, J. M. Swan (в печати).
85. J. M. Swan, *Symposium on Sulfur in Proteins*, 1958, Falmouth, Mass., Acad. Press. Inc., N. Y.
86. J. A. Schellman, *Compt. rend. trav. lab. Carlsberg. Sér. chim.*, **29**, 223, 230 (1955).
87. J. A. Schellman, *Там же*, **30**, 363 (1958).
88. T. L. Hill, *J. Polymer. Sci.*, **23**, 549 (1957).
89. L. Peller, Ph. D. Thesis, Princeton University, 1957.
90. T. L. Hill, *J. Chem. Phys.*, **20**, 1259 (1953).
91. T. L. Hill, *Disc. Faraday Soc.*, **13**, 132 (1953).
92. T. L. Hill, *Statistical Mechanics*, McGraw-Hill Inc., N.-Y. 1956, стр. 432.
93. S. A. Rice, A. Wada, E. P. Geiduschek, *Disc. Faraday Soc.*, **25**, 130 (1958).
94. B. H. Zimm, J. K. Bragg, *J. Chem. Phys.*, **28**, 1246 (1958).
95. J. H. Gibbs, E. A. di Marzio, *Там же*, **28**, 1247 (1958).
96. R. Lumry, H. Eyring, *J. Phys. Chem.*, **58**, 110 (1954).
97. J. A. Schellman, *Там же*, **62**, 1485 (1958).
98. P. Doty, J. T. Yang, *J. Am. Chem. Soc.*, **78**, 498 (1956).
99. M. Davies, *Ann. Repts. on Progr. Chem. (Chem Soc., London)*, **43**, 5 (1946).
100. C. A. Coulson, *Valence*, Oxford Univ. Press, London, 1952.
101. W. Kauzmann, в книге *The Mechanism of Enzyme Action* под ред. W. D. McElroy, B. Glass, Johns-Hopkins Press, Baltimore, 1954, стр. 70.
102. J. T. Edsall, *J. Cellular Comp. Physiol.*, **47**, supp. 1, 163 (1956).
103. J. Hermans, мл., S. J. Leach, H. A. Scheraga, неопубликованные данные.
104. M. Laskowski, мл., H. A. Scheraga, *J. Am. Chem. Soc.*, **76**, 6305 (1954).
105. G. I. Loeb, H. A. Scheraga, *J. Phys. Chem.*, **60**, 1633 (1956).
106. M. Laskowski мл., S. Ehrenpreis, T. H. Donnelly, H. A. Scheraga, *J. Am. Chem. Soc.*, **82**, 1340 (1960).
107. M. Laskowski, мл. H. A. Scheraga, *J. Am. Chem. Soc.*, **78**, 5793 (1956).
108. H. A. Scheraga, M. Laskowski, мл., *Advances in Protein Chem.*, **12**, 1 (1957).
109. S. Ehrenpreis, E. Sullivan, H. A. Scheraga, *Abstr. 133rd Meeting Am. Chem. Soc., San Francisco*, 26C, April, 1958.
110. J. M. Sturtevant, M. Laskowski, мл., T. H. Donnelly, H. A. Scheraga, *J. Am. Chem. Soc.*, **77**, 6168 (1955).
111. M. Laskowski, мл., H. A. Scheraga, *Abstr. 124th Meeting Am. Chem. Soc., Chicago*, 36C, Sept. 1953.
112. P. Doty, A. Wada, J. T. Yang, E. R. Blout, *J. Polymer Sci.*, **23**, 851 (1957).
113. M. G. Evans, J. Gergely, *Biochim. et Biophys. Acta*, **3**, 188 (1949).
114. J. C. Jungers, K. F. Bonhoeffer, *Ztschr. phys. chem.*, **177**, 460 (1936).
115. J. Hine, C. H. Thomas, *J. Am. Chem. Soc.*, **75**, 739 (1953).
116. J. B. Speakman, *J. Soc. Leath Trades Chem.*, **37**, 37 (1953).
117. R. D. B. Fraser, *Nature*, **176**, 358 (1955).
118. R. D. B. Fraser, T. P. MacRae, *J. Chem. Phys.*, **28**, 1120 (1958).
119. H. Lenormant, E. R. Blout, *Nature*, **172**, 770 (1953).
120. H. Lenormant, E. R. Blout, *Bull. soc. chim. (France)*, **1954**, 859.

121. I. M. Krause, K. Linderström-Lang, *Compt. rend. trav. lab. Carlsberg, Sér. chim.*, **29**, 367 (1955).
122. A. Hvidt, G. Johansen, K. Linderström-Lang, F. Vaslow, *Compt. rend. trav. lab. Carlsberg, Sér. chim.*, **29**, 129 (1954).
123. K. Linderström-Lang, *Nature*, **139**, 713 (1937).
124. K. Linderström-Lang, H. Lanz, мл. *Compt. rend. trav. lab. Carlsberg, Sér. chim.*, **21**, 315 (1938).
125. K. Linderström-Lang, O. Jacobsen, G. Johansen, *Там же*, **23**, 17 (1938).
126. A. Hvidt, K. Linderström-Lang, *Там же*, **29**, 385 (1955).
127. A. Hvidt, K. Linderström-Lang, *Там же*, **14**, 574 (1954).
128. A. Hvidt, K. Linderström-Lang, *Там же*, **16**, 168 (1955).
129. A. Berger, K. Linderström-Lang, *Arch. Biochem. and Biophys.*, **69**, 106 (1957).
130. C. E. Бреслер, *Disc. Faraday Soc.*, **25**, 158 (1958).
131. C. Larr, J. Narchal, *C. r.*, **247**, 86 (1958).
132. J. Léonis, C. H. Li, *Abstr. 131st Meeting Am. Chem. Soc., Miami*, 53C, April 1957.
133. S. J. Leach, *Revs. Pure Appl. Chem. Australia*, **3**, 25 (1953).
134. L. K. Christensen, *Compt. rend. trav. lab. Carlsberg, Sér. chim.*, **28**, 37 (1952).
135. R. B. Simpson, W. Kauzmann, *J. Am. Chem. Soc.*, **75**, 5139 (1953).
136. H. A. Barker, *J. Biol. Chem.*, **103**, 1 (1933).
137. M. A. Golub, E. E. Pickett, *J. Polymer Sci.*, **13**, 427 (1954).
138. M. Spiegel-Adolf, *Biochem. Ztg.*, **170**, 126 (1926).
139. L. F. Hewitt, *Biochem. J.*, **28**, 575 (1934).
140. C. Cohen, *Nature*, **175**, 129 (1955).
141. P. Drude, *The Theory of Optics*, Leipzig, 1900.
142. V. L. Rosenfield, *Ztschr. Physik*, **52**, 161 (1928).
143. W. Kauzmann, *Quantum Chemistry*, Academic Press, Inc., N. Y., 1957, стр. 616, 703.
144. J. G. Kirkwood, *J. Chem. Phys.*, **5**, 479 (1937).
145. E. U. Condon, W. Altar, H. Eyring, *Там же*, **5**, 753 (1937).
146. W. Kauzmann, J. E. Walter, H. Eyring, *Chem. Revs.*, **26**, 339 (1940).
147. H. Kuhn, *J. Chem. Phys.*, **17**, 1198 (1949).
148. N. S. Bayliss, *Quart. Revs.*, **6**, 319 (1952).
149. W. W. Wood, W. Fickett, J. G. Kirkwood, *J. Chem. Phys.*, **20**, 561 (1952).
150. D. D. Fitts, J. G. Kirkwood, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, **42**, 33 (1956).
151. D. D. Fitts, J. G. Kirkwood, *J. Am. Chem. Soc.*, **78**, 2650 (1956).
152. W. Moffitt, *J. Chem. Phys.*, **25**, 467 (1956).
153. W. Moffitt, J. T. Yang, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, **42**, 596 (1956).
154. W. Moffitt, *Там же*, **42**, 736 (1956).
155. B. Jirgensons, *Arch. Biochem. and Biophys.*, **39**, 261 (1952).
156. B. Jirgensons, *Там же*, **41**, 333 (1952).
157. W. F. Harrington, *Abstr. 133rd Meeting Am. Chem. Soc., San Francisco*, 33Q, April 1958.
158. W. F. Harrington, M. Sela, *Biochim. et Biophys. Acta*, **27**, 24 (1958).
159. H. Murakami, *J. Chem. Phys.*, **27**, 1231 (1957).
160. C. Schellman, J. A. Schellman, *Compt. rend. trav. lab. Carlsberg, Sér. chim.*, **30**, 463 (1958).
161. J. A. Schellman, *Abstr. 133rd Meeting Am. Chem. Soc., San Francisco*, 33Q, April 1958.
162. H. Edelhoch, R. E. Lippoldt, *Biochim. et Biophys. Acta*, **30**, 657 (1958).
163. L. Hewitt, *Biochem. J. (London)*, **21**, 216 (1927).
164. K. Linderström-Lang, J. A. Schellman, *Biochim. et Biophys. Acta*, **15**, 156 (1954).
165. J. A. Schellman, C. G. Schellman, *Arch. Biochem. and Biophys.*, **65**, 58 (1956).
166. K. Imahori, E. Klemperer, P. Doty, *Abstr. 131st Meeting Am. Chem. Soc., Miami*, 54C, April 1957.
167. B. Jirgensons, *Arch. Biochem. and Biophys.*, **74**, 57 (1958).
168. W. F. Harrington, J. A. Schellman, *Compt. rend. trav. lab. Carlsberg, Sér. chim.*, **30**, 167 (1957).
169. G. Markus, F. Karush, *J. Am. Chem. Soc.*, **80**, 89 (1958).
170. B. Jirgensons, *Arch. Biochem. and Biophys.*, **74**, 70 (1958).
171. W. F. Harrington, J. A. Schellman, *Compt. rend. trav. lab. Carlsberg, Sér. chim.*, **30**, 21 (1956).
172. R. E. Weber, C. Tanford, *Abstr. 134th Meeting Am. Chem. Soc., Chicago*, 26C, Sept. 1958.
173. B. Jirgensons, L. Straumanis, *Arch. Biochem. and Biophys.*, **68**, 319 (1957).
174. B. Jirgensons, *Там же*, **71**, 148 (1957).
175. C. Cohen, *J. Biophys. Biochem. Cytology*, **1**, 203 (1955).
176. W. F. Harrington, *Nature*, **181**, 998 (1958).
177. C. B. Kretschmer, *J. Phys. Chem.*, **61**, 1627 (1957).

178. C. Tanford, Abstr. 134th Meeting Am. Chem. Soc., Chicago, 50C, Sept. 1958.
179. P. Doty, R. D. Lundberg, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., **43**, 213 (1957).
180. A. Elliott, W. E. Hanby, B. R. Malcolm, Nature, **178**, 1170 (1956).
181. A. R. Downie, A. Elliott, W. E. Hanby, B. R. Malcolm, Proc. Roy. Soc., **242**, 328 (1957).
182. E. R. Blout, R. H. Karlson, P. Doty, B. Hargitay, J. Am. Chem. Soc., **76**, 4492 (1954).
183. C. Cohen, A. G. Scent-Gyorgyi, Там же, **79**, 248 (1957).
184. A. G. Scent-Gyorgyi, C. Cohen, Science, **126**, 697 (1957).
185. E. Katchalski, Abstr. 133rd Meeting Am. Chem. Soc., San Francisco, 33Q, April 1958.
186. E. R. Blout, R. H. Karlson, J. Am. Chem. Soc., **80**, 1259 (1958).
187. M. L. Huggins, Там же, **74**, 3963 (1952).
188. A. Elliott, B. R. Malcolm, Proc. Roy. Soc., **249**, 30 (1958).
189. H. Lindley, Biochim. et Biophys. Acta, **18**, 194 (1955).
190. W. Moffitt, D. D. Fitts, J. G. Kirkwood, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., **43**, 723 (1957).
191. B. A. Toms, A. Elliott, Nature, **169**, 877 (1952).
192. J. F. Foster, T. Yang, J. Am. Chem. Soc., **76**, 1015 (1954).
193. I. M. Klotz, R. E. Heinley, Biochim. et Biophys. Acta, **25**, 205 (1957).
194. W. Kauzmann, Там же, **28**, 87 (1958).
195. B. Jirgensons, Abstr. 133rd Meeting Am. Chem. Soc., San Francisco, 34Q, April 1958.
196. P. Doty, K. Imahori, Science, **126**, 1231 (1957).
197. F. Karush, J. Phys. Chem., **56**, 70 (1952).
198. F. Karush, J. Am. Chem. Soc., **76**, 5536 (1954).
199. I. M. Klotz, J. Ayers, Disc. Faraday Soc., **13**, 189 (1953).
200. G. Scatchard, Am. Scientist, **40**, 61 (1952).
201. C. Tanford, Proc. Iowa Acad. Sci., **59**, 206 (1952).
202. T. Yang, J. F. Foster, J. Am. Chem. Soc., **76**, 1588 (1954).
203. T. Yang, J. F. Foster, Там же, **77**, 3895 (1955).
204. C. Tanford, J. G. Buzell, D. G. Rands, S. A. Swanson, Там же, **77**, 6421 (1955).
205. G. Weber, Biochem. J. (London), **51**, 155 (1952).
206. P. Bro, S. J. Singer, J. M. Sturtevant, J. Am. Chem. Soc., **77**, 4924 (1955).
207. K. Aoki, J. F. Foster, Там же, **78**, 3538 (1956).
208. K. Aoki, J. F. Foster, Там же, **79**, 3385, 3393 (1957).
209. M. D. Sterman, J. F. Foster, Там же, **78**, 3652 (1956).
210. J. F. Foster, M. D. Sterman, Там же, **78**, 3656 (1956).
211. M. J. Kronman, J. F. Foster, Arch. Biochem. and Biophys., **72**, 205 (1957).
212. P. Doty, частное сообщение.
213. C. M. Kay, K. Bailey, Biochim. et Biophys. Acta, **31**, 20 (1959).
214. C. M. Kay, Там же, **27**, 469 (1958).
215. P. Cowan, S. McGavin, Nature, **176**, 501 (1955).
216. J. Kurtz, A. Berger, E. Katchalski, Там же, **178**, 1066 (1956).
217. K. Linderström-Lang, Lane Memorial Lectures «Proteins and Enzymes», Stanford University Press, 1952, стр. 115.
218. J. D. Bernal, Disc. Faraday Soc., **25**, 7 (1958).
219. L. Pauling, Там же, **13**, 170 (1953).
220. G. E. Perlmann, Biochim. et Biophys. Acta, **13**, 452 (1954).
221. G. E. Perlmann, Nature, **174**, 273 (1954).
222. G. E. Perlmann, Advances in Protein Chem., **10**, 1 (1955).
223. D. B. Wetlaufer, J. T. Edsall, B. R. Hollingworth, J. Biol. Chem., **233**, 1421 (1958).
224. H. B. Bull, Advances in Enzymol., **1**, 1 (1941).
225. R. D. B. Fraser, Proc. Internat. Wool Textile Res. Conf. Australia, 1955, B130 (1956).
226. C. Ressler, Science, **128**, 1281 (1958).
227. J. E. Turner, R. T. Bottle, F. Haurowitz, J. Am. Chem. Soc., **80**, 4117 (1958).
228. J. E. Turner, F. Haurowitz, Abstr. 134th Meeting Am. Chem. Soc., Chicago, 25C, Sept. 1958.
229. L. F. Fieser, Rec. trav. chim. Pays-Bas, **69**, 410 (1950).
230. B. Harrap, E. F. Woods (в печати).
231. F. Karush, Abstr. 131st Meeting Am. Chem. Soc., Miami, 53C (1957).
232. B. Jirgensons, T. Ikenaka, Abstr. 134th Meeting Am. Chem. Soc., Chicago, 34C, Sept. 1958.
233. F. C. McDuffie, M. J. Hunter, Abstr. 126th Meeting Am. Chem. Soc., New York, 79C, Sept. 1954.
234. M. E. Reichmann, J. R. Colvin, Can. J. Chem., **33**, 163 (1955).
235. E. F. Woods, Australian J. Chem., **12**, 497 (1959).
236. J. M. Swan, Nature, **180**, 643 (1957).

237. J. F. Pechère, G. H. Dixon, R. H. Maybury, H. Neurath, *J. Biol. Chem.*, **233**, 1364 (1958).
238. S. J. Leach (в печати).
239. S. J. Leach, *Biochim. et Biophys. Acta*, **33**, 264 (1959).
240. H. Fraenkel-Conrat, A. Mohammad, E. D. Ducay, D. K. Mecham, *J. Am. Chem. Soc.*, **73**, 625 (1951).
241. G. Markus, F. Karush, Там же, **79**, 134 (1957).
242. S. J. Leach, I. J. O'Donnell (в печати).
243. I. J. O'Donnell, E. F. Woods, *J. Polymer Sci.*, **21**, 397 (1956).
244. B. H. Harrop, E. F. Woods, *Aust. J. Chem.*, **11**, 581 (1958).
245. U. Hasserodt, J. Vinograd, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, **45**, 12 (1959).
246. E. L. Smith, *J. Biol. Chem.*, **233**, 1392 (1958).
247. R. R. Porter, F. Sanger, *Biochem. J. (London)*, **42**, 287 (1948).
248. C. Tanford, *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 3931 (1957).
249. J. Steinhardt, E. M. Zaiser, *Advances in Protein Chem.*, **10**, 151 (1955).
250. S. Beychok, J. Steinhardt, *Abstr. 134th Meeting Am. Chem. Soc., Chicago*, 41C, Sept. 1958.
251. J. I. Morton, H. F. Deutsch, Там же, 26C, Sept. 1958.
252. J. Wyman, *Advances in Protein Chem.*, **4**, 407 (1948).
253. Ф. Гауровитц, *Химия и биология белков*, ИЛ, 1953.
254. J. L. Crammer, A. Neuberger, *Biochem. J. (London)*, **37**, 302 (1943).
255. M. Levy, A. E. Benaglia, *J. Biol. Chem.*, **186**, 829 (1950).
256. C. Tanford, G. L. Roberts, *J. Am. Chem. Soc.*, **74**, 2509 (1952).
257. C. Tanford, Там же, **72**, 441 (1950).
258. I. M. Klotz, *Cold Spring Harbor Symposia Quant. Biol.*, **14**, 97 (1949).
259. A. W. Kenchington, A. G. Ward, *Biochem. J. (London)*, **58**, 202 (1954).
260. J. M. Luck, *Disc. Faraday Soc.*, **13**, 235 (1953).
261. W. G. Grewther, *Proc. Internat. Wool Textile Res. Conf. Australia*, 1955, C. 227 (1956).
262. H. Edelhoch, *J. Am. Chem. Soc.*, **80**, 6648 (1958).
263. H. A. Scheraga, *Ann. Rev. Phys. Chem.*, **10** (1959).
264. H. K. Frensdorff, M. F. Watson, W. Kauzmann, *J. Am. Chem. Soc.*, **75**, 5157, 5167 (1953).
265. P. J. Flory, Там же, **78**, 5222 (1956).
266. W. J. Wolf, J. J. Rackis, A. K. Smith, H. A. Sasame, G. E. Babcock, Там же, **80**, 5730 (1958).
267. E. Schauenstein, *Acta Histochemica*, **4**, 208 (1957).
268. J. T. Edsall и другие, *J. Am. Chem. Soc.*, **80**, 3807, 3813, 3818, 3823, 3827 (1958).