

УДК 549.49 : 541.486

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ С МЕТАЛЛАМИ

E. E. Крисс, K. B. Яцимирский

ОГЛАВЛЕНИЕ

1. Введение	349
2. Строение и свойства нуклеиновых кислот	349
3. Влияние ионов металлов на свойства нуклеиновых кислот	352
4. Соединения нуклеиновых кислот с металлами	355
5. Строение комплексов металлов с нуклеиновыми кислотами	358
6. Прочность комплексных соединений металлов с ДНК	362

1. Введение

Нуклеиновые кислоты играют большую роль в процессах биосинтеза белка, роста, размножения и наследственности живых организмов. Однако пока очень мало известно о конкретном механизме их участия в этих процессах; этим объясняется значительный интерес исследователей к различного рода реакциям нуклеиновых кислот.

В последние годы установлено, что нуклеиновые кислоты взаимодействуют с ионами многих металлов. В результате такого взаимодействия изменяется ряд свойств нуклеиновых кислот. Вполне вероятно, что взаимодействие с металлами имеет большое значение в биологической функции нуклеиновых кислот. Однако исследования в этом направлении еще крайне незначительны, и пока не существует прямых доказательств того, что металлы играют существенную роль в биологической функции нуклеиновых кислот.

Изучение реакций комплексообразования между металлами и нуклеиновыми кислотами имеет также самостоятельный интерес в связи с поисками так называемых электронных красителей для электронной микроскопии нуклеиновых кислот (ионы металлов в соединениях с нуклеиновыми кислотами могут представлять собой электронные красители), и для получения особо чистых препаратов нуклеиновых кислот.

Для понимания реакций, происходящих между ионами металлов и нуклеиновыми кислотами, кратко рассмотрим строение и свойства последних.

2. Строение и свойства нуклеиновых кислот

Нуклеиновые кислоты представляют собой линейные полимеры¹, содержащие в своих звеньях остатки фосфорной кислоты, пятиуглеродных сахаров [дезоксирибозы в дезоксирибонуклеиновой кислоте (ДНК) и рибозы в рибонуклеиновой кислоте (РНК)] и гетероциклических азотистых оснований (пуриновых и пиридиновых).

Отрезки полимерных цепей ДНК и РНК представлены на рис. 1, который условно изображает четыре звена каждой цепи. Мономерные звенья отличаются друг от друга строением: пуринового или пиридинового

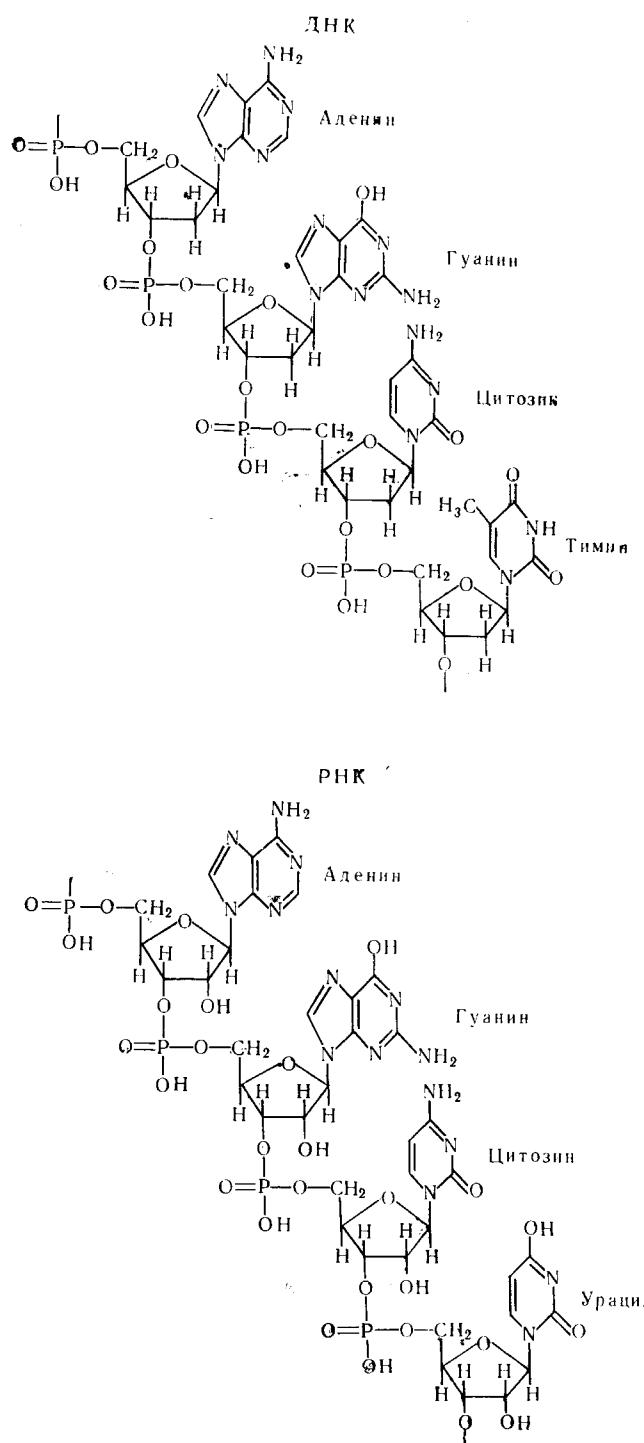


Рис. 1. Отрезки полимерных цепей ДНК и РНК

основания. Природные длинные молекулы нуклеиновых кислот состоят из многих тысяч разнообразно чередующихся мономерных звеньев. Из рис. 1 видно, что цепь ДНК отличается от цепи РНК не только составом сахаров, но и составом пиримидиновых оснований. Присутствующий в ДНК тимин заменен в РНК урацилом.

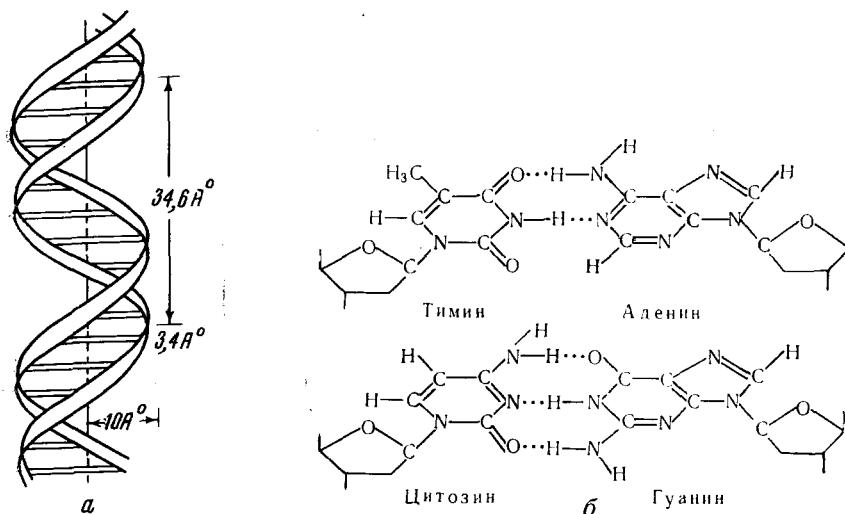


Рис. 2. Макромолекулярная структура ДНК: а — две спирали — фосфато-дезоксирибозные цепи, горизонтальные линии — пары азотистых оснований, связывающих обе цепи водородными связями; б — водородные связи в парах оснований

Изучение рентгенограмм пленок нуклеиновых кислот показало, что структура ДНК значительно более упорядочена, чем структура РНК, и что ДНК представляет собой двухцепочечную спираль с диаметром 20 Å и длиной витка 34,6 Å. Виток спирали содержит 10 мономерных звеньев. Боковые группы — пуриновые и пиримидиновые основания — упакованы в середине спирали.

Согласно модели Крика и Уотсона², эти основания в двухцепочечной молекуле ДНК расположены таким образом, что аденину в одной цепи всегда противостоит тимин в другой, а гуанину, противостоит цитозин. Обе цепи связаны между собой водородными связями (см. рис. 2).

Молекула РНК состоит из одной гибкой полинуклеотидной цепочки, конфигурация которой не является стабильной и фиксированной, а определяется окружающей средой³⁻⁶. Благодаря водородным связям в некоторых местах цепочка РНК сворачивается в двойную нить, образующую отдельные витки спирали. Между витками беспорядочно расположены одноцепочечные участки. Эта вторичная структура РНК, в свою очередь, не остается стабильной, — в зависимости от условий расположение спиральных участков может стать упорядоченным: образуются более сложные компактные клубки третичной структуры. Макромолекулярная структура РНК представлена на рис. 3⁵.

Водородные связи создают определенную структурную жесткость нуклеиновых кислот, которая, по-видимому, вообще характерна для макромолекул биополимеров и определяет их биологическую функцию⁷. Разрушение водородных связей изолированных нуклеиновых кислот наблюдается в узком интервале температур; при этом происходит как

бы «плавление» внутримолекулярной регулярной структуры с переходом спиралей в беспорядочные клубки⁸. Этот процесс называется денатурацией. Переход из нативного состояния в денатурированное («фазовый переход») может происходить не только при нагревании, но и вследствие действия других факторов. За этим переходом можно следить по изменению светопоглощения растворов нуклеиновых кислот в УФ области.

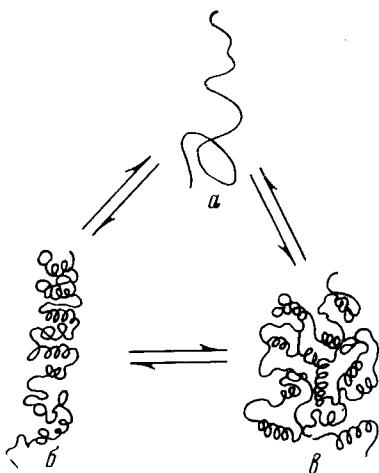


Рис. 3. Макромолекулярная структура РНК: *а* — первичная структура — рыхлый беспорядочный клубок или распрямленная цепь; *б* — вторичная структура — компактная палочка с более или менее упорядоченно ориентированными двухспиральными участками; *в* — третичная структура — компактный клубок со спиральными участками

В спектре нуклеиновых кислот имеется полоса поглощения в близкой УФ области, объясняющаяся поглощением света хромофорными группами гетероциклических оснований. Максимум полосы находится примерно при 260 $\text{m}\mu$. Величина оптической плотности нативных нуклеиновых кислот на $\sim 40\%$ ниже, чем суммарная оптическая плотность составляющих их мономеров. Это снижение (гиперхромный эффект) объясняется параллельным расположением хромофорных групп оснований в нативных препаратах. При денатурировании оптическая плотность повышается. Этот гиперхромный эффект объясняют нарушением параллельного расположения хромофорных групп оснований при фазовых переходах из спиралеобразных упорядоченных форм в менее упорядоченные. Понижение оптической плотности указывает, таким образом, на увеличение структурной жесткости нуклеиновых кислот вследствие усиления их спирализации, а повышение оптической плотности на их деградацию, на дезориентацию хромофорных групп, на любое нарушение упорядоченности^{1, 9–12}.

Некоторые сведения о размерах, форме и молекулярном весе макромолекул нуклеиновых кислот были получены с помощью седиментационного анализа, измерений вязкости и скорости диффузии¹³.

3. Влияние ионов металлов на свойства нуклеиновых кислот

Нуклеиновые кислоты, выделенные из различных биологических объектов, обычно содержат незначительные количества ионов одного или нескольких металлов^{14–28}. Так, Уокер и Вали²⁹ сообщили о наличии в препаратах ДНК и РНК хрома, никеля, железа, марганца, цинка и других металлов. Содержание некоторых металлов в нуклеиновых кислотах различного происхождения постоянно, а связь металлов с нуклеиновой кислотой настолько прочна, что они трудно отделяются даже с помощью таких сильных хелатообразующих реагентов как этилендиаминетраук-

кусная кислота, 8-оксихинолин, дитизон и др.²⁹. Эти факты свидетельствуют, что металлы образуют с макромолекулами нуклеиновых кислот химические связи.

Выше указывалось, что пока нет прямых доказательств участия металлов в биологической функции нуклеиновых кислот. Однако предполагается, что ионы металлов осуществляют связь между нуклеиновыми кислотами и белками³⁰, играют фундаментальную роль в структуре и функции нуклеопротеидов^{31, 32}, влияют на синтез протеинов и передачу наследственной информации²⁹. По мнению Гольдштейна и Герасимовой³³, особая роль в функции ДНК принадлежит ионам Fe^{3+} : они принимают участие в образовании связей между отдельными цепями ДНК и вследствие этого способны регулировать процессы денатурации ДНК, а также являются причиной неферментативного поперечного разрыва молекул ДНК. Согласно гипотезе Иванова³⁴, биосинтез ДНК связан с окислительно-восстановительными превращениями ионов железа или меди при их хелатировании с ДНК, причем окисление ионов металлов вызывает ослабление связей между комплементарными парами оснований ДНК, а восстановление — стабилизацию двухтяжевой конформации ДНК. Возможным переносчиком электрона в процессах окисления и восстановления железа в ДНК может служить, по-видимому, аскорбиновая кислота, которая принимает участие в процессе синтеза ДНК в клетке³⁵. Правдоподобность такого рода предположений подтверждается изменением свойств изолированных нуклеиновых кислот и нуклеопротеидов под действием ионов различных металлов. Перечислим некоторые из этих фактов.

Размеры и форма супспендированных в цитоплазме нуклеопротеидов и степень их полимеризации зависят от концентрации ионов магния в среде^{32, 36-38}. Ионы щелочно-земельных металлов влияют на структуру и свойства хромосом³⁹⁻⁴⁴. В присутствии ионов металлов РНК проявляет устойчивость по отношению к действию рибонуклеазы^{45, 46}, макромолекулярная конфигурация РНК зависит от ионной силы раствора^{6, 12}. Ионы различных металлов изменяют инфекционность РНК вируса табачной мозаики^{25, 47}. Так, например, найдено, что инфекционность РНК этого вируса изменяется параллельно содержанию железа в препаратах²⁵. Сильнее всех других ионов металлов оказывают влияние на инфекционность РНК ионы никеля⁴⁷. Правда, некоторые авторы⁴⁸ предполагают, что ионы металлов влияют лишь на физические свойства РНК вируса табачной мозаики, но не изменяют ее инфекционности.

Физические свойства РНК действительно существенно зависят от присутствия ионов металлов. Так, скорость седиментации растворов нуклеиновых кислот⁴⁹ и их вязкость⁵⁰ уменьшаются в присутствии ионов Mn^{2+} , Ni^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} . Ионы Na^+ и K^+ действуют значительно слабее, чем приведенные выше, и для достижения того же эффекта концентрация ионов щелочных металлов должна быть на 2-3 порядка выше, чем концентрация двухзарядных ионов.

Температура плавления нуклеиновых кислот зависит от ионного окружения^{3, 51, 52}. При прибавлении к ДНК хлорида натрия существует линейная зависимость между температурой плавления и логарифмом ионной силы раствора. Повышение температуры плавления с ростом ионной силы объясняют^{3, 51} стабилизацией ДНК по отношению к денатурированию. Предполагается, что добавление электролита ведет к экранированию зарядов в цепях ДНК и этим уменьшает силы электростатического отталкивания между заряженными фосфатными группами, способствуя увеличению жесткости структуры.

Аналогично хлориду натрия температуру плавления ДНК повышают ионы марганца, кобальта, цинка и никеля, но ионы меди, кадмия и свинца, напротив, понижают ее^{53, 54}. В условиях, способствующих уничтожению водородных связей (нагревание растворов нуклеиновых кислот до 80° или растворение их в 6 М мочевине — агенте, способствующем разрыву водородных связей) такие ионы металлов, как Ni^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Cr^{3+} , понижают оптическую плотность РНК (повышают температуру плавления), а ионы щелочных и щелочно-земельных металлов почти не изменяют ее. Был сделан вывод⁷, что ионы переходных металлов первого периода стабилизируют структуру нуклеиновых кислот за счет образования дополнительных связей между металлом и основаниями кислоты. Образовавшиеся внутримолекулярные связи с металлом оказываются достаточно прочными, чтобы противостоять разрушающему влиянию повышения температуры или действию концентрированного раствора мочевины. В случае РНК стабилизирующее влияние ионов металлов проявляется только при нагревании, когда водородные связи разрушены.

Изменение свойств нуклеиновых кислот при действии на них ряда ионов металлов бывает обратимым. Впервые на эту способность взаимодействия ДНК со ртутью обратил внимание Кац²¹. Он нашел, что размеры молекулы ДНК при реакции с HgCl_2 значительно уменьшаются, а при действии связывающих ртуть реагентов — восстанавливаются. При добавлении ртутных солей к ДНК наблюдались уменьшение характеристической вязкости растворов последней и спектральный сдвиг^{20, 21, 55}. При связывании ртути характеристическая вязкость и положение максимума в спектре поглощения ДНК приобретали первоначальное значение. Обратимые изменения наблюдались также при исследовании скорости седиментации, рассеяния света дисперсии оптического вращения⁵⁶, а также трансформирующей способности⁵⁷ препаратов ДНК*.

Таким образом, не оставалось никаких сомнений в полной обратимости реакции взаимодействия ДНК со ртутью. Это подтверждалось изучением указанной реакции методами, чувствительными по отношению к форме и размерам ДНК (вязкость, скорость седиментации, рассеяние света); особенностям стереохимической конфигурации (дисперсия оптического вращения), наличию хромофорных групп и их относительной ориентации (спектры поглощения в ближней УФ области). Это подтверждалось также с помощью биологических методов (трансформирующая способность).

Такая же обратимость характерна для реакции между РНК вируса табачной мозаики и HgCl_2 ⁵⁶. В отличие от ДНК, однако, в этом случае биологические изменения не оказались полностью обратимыми. Так, ионы Hg^{2+} полностью инактивируют инфекционность РНК вируса табачной мозаики, но удаление этих ионов не приводит к полному восстановлению инфекционности РНК по сравнению с контролем.

По-видимому, к этому же типу обратимых реакций относится взаимодействие ДНК с ионами Fe^{3+} , исследованное Гольдштейном и Герасимовой^{33, 58}. Ионы Fe^{3+} замедляют гидролиз ДНК до нуклеотидов. При введении в раствор, содержащий ДНК и ионы Fe^{3+} , пирофосфата натрия,ющего связать железо, способность ДНК к гидролизу восстанавливается.

* Трансформирующей способностью называется способность ДНК, выделенной из одного штамма бактерий, передавать определенные, свойственные данному потомству признаки, например: устойчивость к определенному яду, другому штамму бактерий. Трансформирующая активность присуща только нативной форме ДНК. Измеряя ее, можно пользоваться этим показателем для количественной характеристики глубины денатурации и денатурации ДНК (1, стр. 269).

Изучение таких обратимых реакций, сопровождающихся глубоким изменением физических свойств нуклеиновых кислот, по-видимому, может иметь большое значение для выяснения биологической функции нуклеиновых кислот.

4. Соединения нуклеиновых кислот с металлами

Лишь небольшое число соединений нуклеиновых кислот с металлами выделено в индивидуальном состоянии. Исследование этих соединений проводили, главным образом, с целью изыскания способов очистки препаратов ДНК. Остановимся несколько подробнее на методе их получения.

Еще в 1924 г. Гаммерстен⁵⁹ наблюдал, что соли лантана и трехвалентного железа осаждают ДНК из раствора. Максимальное осаждение происходило при pH 2,5—4. Было показано, что лантан-нуклеинатное соединение отличается очень низкой растворимостью. Эти наблюдения позднее подтвердились^{60, 61}. Штерн и Штейнберг⁶² выделили и проанализировали соединения ДНК с лантаном, неодимом, празеодимом, самарием, иттрием. Для получения этих соединений к растворам ДНК добавляли растворы хлоридов названных элементов, отделяли фильтрованием выпавший фиброзный осадок и тщательно промывали его водой, а затем спиртом. Высушенные на воздухе препараты имели вид асбестовых волокон, окрашенных в характерный для редкоземельного элемента цвет. Суспензии этих соединений в глицерине в видимой области спектра сильно поглощают свет. Для неодим-нуклеинатного комплекса максимумы полос поглощения приходились на 510—512, 520—525, 570—590 мкм , для празеодим-нуклеинатного комплекса — на 440—450, 465—470, 475—480 мкм . Наблюдался явный сдвиг этих полос по сравнению с полосами для растворов чистых хлоридов редкоземельных элементов. Полосы нуклеинатов оказались значительно более широкими и менее острыми, чем у хлоридов. Растворимость полученных соединений очень мала. Так, например, в фильтрате после отделения нуклеината неодима из водной суспензии, спектрофотометрическим методом не удалось обнаружить неодим по поглощению его при 790 мкм и нуклеиновую кислоту при 260 мкм .

Элементарный анализ полученных веществ показал, что содержание неодима в них составляло 10,5%, а лантана 11,1%.

Взаимодействие между хлоридами лантанидов и нуклеинатом натрия протекает в соответствии с уравнением⁶²



где Ln — лантанид, а ДНК^- — анион натриевой соли дезоксирибонуклеиновой кислоты.

Фосфатные группы полинуклеотидной цепи находятся на расстоянии $\sim 6 \text{ \AA}$ друг от друга. Комбинация одного атома редкоземельного элемента с тремя фосфатными остатками объяснена⁶² образованием круто свернутого полинуклеотидного клубка из одной двухцепочечной спирали ДНК с ионом лантанида в центре его. Предположено также⁶², что ионы лантана могут соединять фосфатные группы соседних нуклеотидных цепей, образуя сетку скрепленных друг с другом нитей различных молекул ДНК. Содержание лантанида в таком комплексе должно составлять 14%. В действительности, как указывалось выше для случая лантана и неодима, содержание лантанида не превышало 11%. Объяснения этому явлению пока не дано.

Стехиометрия комплексообразования металлов с ДНК определялась кондуктометрическим методом^{63, 64}. На кривых кондуктометрического

титрования ДНК ионами металлов магния, марганца, бария, кальция наблюдались изломы, соответствующие стехиометрическому отношению 1 эквивалент иона металла : 1 нуклеотид. Положение изломов не зависело от степени денатурирования ДНК и от исходных концентраций растворов.

В связи с тем, однако, что не всегда^{65, 66} достигалось такое же соотношение, были проведены дополнительные доказательства простой стехиометрии комплексов^{67, 68}. Проводилось кондуктометрическое титрование синтетических полинуклеотидов: полиадениловой (поли-А) и полиуридиловой (поли-У) кислот, в состав которых входило только одно основание. Указанные кислоты способны реагировать друг с другом (эта способность сильно зависит от природы и концентрации ионов металлов, присутствующих в растворе⁶⁹⁻⁷¹). В результате реакции из обеих одноцепочечных кислот образуется двухцепочечная кислота поли-АУ, которая обладает свойствами, напоминающими свойства ДНК^{70, 72, 73}. Было показано, что кривые титрования обоих полимеров и поли-АУ одинаковы и напоминают кривые титрования ДНК ионами магния и ионами марганца. Излом на кривых титрования (если в ходе титрования было взято большое количество точек) соответствовал добавлению 1 эквивалента катиона на 1 моль фосфата полимера. Это отношение не изменилось при титровании как нативной, так и денатурированной ДНК⁷⁴.

ТАБЛИЦА 1

Стехиометрия комплексообразования уранила с ДНК в зависимости от pH и концентрации уранил-иона

(концентрация ДНК приведена в пересчете на нуклеотидное звено или на фосфор нуклеотида)

Опыты проводились при постоянных концентрациях ДНК ($\sim 4-6 \cdot 10^{-6} M$) и переменных значениях pH		Опыты проводились при постоянных значениях pH ($\sim 3,5$) и переменных концентрациях ионов уранила	
pH	Молярное отношение UO_2^{2+}/P	Концентрация UO_2^{2+} , M	Молярное отношение UO_2^{2+}/P
2,3	0,34	$1 \cdot 10^{-2}$	0,7
3,6	0,49	$4,8 \cdot 10^{-2}$	1,3
3,7	0,53	$6 \cdot 10^{-2}$	1,5
4,8	1,72		
5,8	2,42		

уранил — ДНК наносили на график против общей концентрации уранила, содержащегося в исходном растворе. По излому кривой определяли примерный состав комплекса. Показано, что при изменении pH и концентрации уранил-иона меняется стехиометрия образующихся комплексов, как это видно из табл. 1⁷⁵.

Вероятно, это явление можно объяснить способностью металла образовывать соединение не с определенной функциональной группой ДНК, а, в зависимости от условий, с различными группами: фосфатными, амино- и енольными.

Изменение стехиометрии комплексов металл — нуклеиновая кислота в зависимости от pH и концентрации металла наблюдалось также при изучении комплексообразования ионов Co^{2+} , Zn^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} и Mn^{2+} с РНК и ДНК методами равновесного диализа и изотопного разбавления⁷⁶. При повышении концентрации иона металла увеличивается связывание металла. В табл. 2 приведены результаты определения величин «степени связывания» при различных значениях pH и постоянной концентрации иона металла, выраженные в количестве атомов металла, приходящихся на один атом фосфора ДНК.

Изучение комплексообразования различных металлов с ДНК проведено также с использованием метода ЯМР⁷⁷. Парамагнитные ионы

Состав комплексов уранила с ДНК также определяли графическим методом⁷⁵. Равновесную концентрацию ионов уранила в растворе после осаждения комплекса ура-

ТАБЛИЦА 2

Связывание ионов некоторых двухзарядных металлов с ДНК при различных значениях pH и постоянной концентрации иона металла
(концентрация: иона металла 10^{-2} г/л; $\text{Ca}^{2+} 2,1 \cdot 10^{-2}$ г/л; ДНК 10^{-5} г)

pH	Число ионов металла, приходящихся на атом фосфора РНК					Число ионов металла, приходящихся на атом фосфора ДНК				
	Co^{2+}	Zn^{2+}	Ca^{2+}	Mn^{2+}	Mg^{2+}	Co^{2+}	Zn^{2+}	Ca^{2+}	Mn^{2+}	Mg^{2+}
3,6	0,140	0,056	0,058	0,035	0,032	0,028	0,020	0,029	0,018	0,029
4,0	0,144	0,078	0,068	0,042	0,045	0,036	0,026	0,040	0,026	0,035
4,4	0,137	0,090	0,062	0,049	0,045	0,037	0,028	0,043	0,026	0,038
4,8	0,129	0,095	0,059	0,047	0,051	0,039	0,029	0,043	0,024	0,035
5,2	0,115	0,088	0,065	0,047	0,048	0,040	0,026	0,042	0,022	0,031
5,6	0,110	0,081	0,059	0,047	0,046	0,037	0,024	0,041	0,019	0,030
6,0	0,114	0,092	0,067	0,050	0,052	0,040	0,026	0,040	0,022	0,030
6,4	0,114	0,086	0,066	0,050	0,048	0,042	0,028	0,039	0,020	0,029
6,8	0,102	0,088	0,067	0,051	0,043	0,037	0,027	0,040	0,020	—
7,2	0,104	0,085	0,069	0,050	—	0,031	0,028	0,042	0,021	—
7,6	—	0,089	0,068	0,048	0,045	—	—	0,036	0,021	0,029
8,0	0,109	—	0,071	—	0,044	0,038	0,029	0,039	—	0,031
8,4	—	—	0,071	—	—	—	—	—	—	—
8,8	—	—	0,071	—	—	—	—	—	—	—

металлов в водном растворе сокращают время спин-решеточной релаксации протонов воды. Время релаксации протонов в водном растворе, содержащем парамагнитные ионы металлов, зависит не только от концентрации металла, но и от химического окружения его. Замечено, что большая эффективность в сокращении времени релаксации достигается в том случае, когда металл находится в окружении малых ионов или молекул, чем в том случае, когда металл находится внутри большой молекулы.

Была произведена теоретическая оценка уменьшения времени релаксации при связывании иона металла тем или иным участком молекулы ДНК (под участками связывания ДНК понимают фосфатные, амино- и енольные группы молекулы) и рассчитанные величины сравнены с полученными экспериментальными данными. На этом основании определены вероятные участки связывания ДНК с различными металлами и «емкость» молекулы ДНК по отношению к этим металлам. В табл. 3 приведены эти величины.

Как следует из табл. 3, для ионов железа и хрома сохраняется то же соотношение при комплексообразовании: 1 эквивалент металла — 1 нуклеотид. Ионы марганца выпадают из этого правила.

При изучении взаимодействия ионов металлов с РНК вируса табачной мозаики с помощью меченых атомов (сравнивалась радиоактивность раствора соли металла до взаимодействия с РНК с радиоактивностью смеси растворов соли металла и РНК после удаления из нее комплекса металла — РНК центрифугированием) найдено, что РНК связывает 0,5 моля соли кальция на нуклеотид и ~ 1 моль соли ртути или серебра на нуклеотид⁷⁸.

ТАБЛИЦА 3

Определение числа доступных поглощению участков ДНК

Ион металла	Число ионов металла, приходящихся на 1 мг ДНК	Число эквивалентов металла, приходящихся на 1 нуклеотид
Mn^{2+}	$7 \cdot 10^{17}$	0,7
Cr^{3+}	$7 \cdot 10^{17}$	1,1
Fe^{3+}	$8 \cdot 10^{17}$	1,2

Несмотря на то, что состав образующихся комплексов металлов с нуклеиновыми кислотами часто отвечает простым стехиометрическим отношениям, следует иметь в виду, что простая стехиометрия может не соблюдаться из-за возможности комплексообразования металла с различными функциональными группами нуклеиновых кислот.

5. Строение комплексов металлов с нуклеиновыми кислотами

При изучении строения соединений указанного типа обычно определяют участок связи металла с нуклеиновой кислотой. Для идентификации участка часто сравнивают реакции металлов с нативной и денатурированной формами ДНК. Предполагается, что если эти реакции не зависят от формы ДНК, то связь кислоты с металлом осуществляется посредством фосфатных групп. Если же реакция зависит от формы ДНК, — это свидетельствует о возникновении связи между металлом и пуриновыми или пиримидиновыми основаниями кислоты. В нативной ДНК эти основания, как уже отмечалось, связаны водородными связями и, следовательно, их взаимодействие с ионами металлов затруднено.

С применением метода кондуктометрического титрования^{63, 64, 74} найдено, что ионы магния, марганца, бария и кальция ведут себя одинаково по отношению к нативной и денатурированной ДНК. Положение и характер изломов на кривых титрования кислоты этими ионами не зависит от степени денатурирования, и в широкой области концентраций отвечает определенному стехиометрическому отношению ДНК и ионов металлов. Следовательно, можно предположить, что эти ионы металлов соединены с фосфатными группами ДНК. Этот вывод подтверждается и следующими фактами⁷⁴. Известно⁷⁹, что краситель акридиновый оранжевый реагирует только с фосфатными группами нуклеиновых кислот в отношении 1:1 и что кривые кондуктометрического титрования ДНК этим красителем аналогичны кривым титрования ДНК ионами Mg^{2+} или Ba^{2+} , а также кривым титрования поли-А, поли-У и поли-АУ этими ионами. Таким образом, взаимодействие указанных ионов металлов с различными полинуклеотидами не зависит от состава оснований и определяется фосфатными группами.

При изучении взаимодействия тех же ионов металлов с нуклеиновыми кислотами методом равновесного диализа⁷⁶ также не было замечено различий в значениях степени связывания для одного и того же иона в зависимости от формы ДНК. Было изучено также влияние ионов магния и кальция на флуоресценцию кольца аденина, аденоцина, аденоцинмонофосфата, аденоциндиfosфата и аденоцинтрифосфата⁸⁰. Максимальная интенсивность флуоресценции этих веществ, наблюдаемая при 395 $m\mu$, изменялась в ряду: аденоцин < аденоцинмонофосфат < аденоциндифосфат, аденин < аденоцинтрифосфат. Ионы магния и кальция примерно в равной степени понижали флуоресценцию аденоцинмонофосфата и аденоциндифосфата до интенсивности аденоцинмонофосфата и аденоцина соответственно. Эти данные служат еще одним подтверждением того, что ионы магния и кальция связываются главным образом с фосфатной половиной нуклеотида и не присоединяются к кольцу оснований.

Изучение влияния ионов металлов на температуру плавления нуклеиновых кислот также может быть применено для определения участков связывания. Известно^{53, 54}, что ионы Mn^{2+} , CO^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} повышают температуру плавления, а ионы Cu^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} — понижают ее. Это явление объясняют^{53, 54} тем, что металлы первой группы связываются с фосфатными остатками на поверхности ДНК, при этом

предотвращается электростатическое отталкивание отрицательно заряженных фосфатных остатков и стабилизируется молекула ДНК. Металлы второй из указанных групп связываются с пуриновыми или пиримидиновыми основаниями внутри спирали, в местах водородных связей и дестабилизируют молекулу ДНК.

С помощью метода ЯМР⁷⁷ также установлено, что ионы Mn^{2+} , Fe^{2+} , CO^{2+} , Ni^{2+} , Cr^{3+} вероятнее всего связываются с фосфатными группами, а не с азотистыми основаниями ДНК, а ионы Fe^{3+} с азотистыми основаниями. Что касается ионов меди, то они вызывают агрегацию молекул ДНК и, по мнению авторов⁷⁷, связаны с вицесмежными — фосфатными участками ДНК. Однако в спектрах ЭПР растворов ДНК, обработанных ионами Cu^{2+} , обнаружены сигналы, которые объясняют⁸¹ образованием связи между ионами меди и основаниями ДНК.

Взаимодействие уранил-иона с ДНК⁷⁵, по-видимому, происходит за счет фосфатных групп. При исследовании комплексообразующей способности ряда фосфатов по отношению к иону уранила найдено, что молярное отношение уранила к фосфору увеличивается с увеличением числа фосфатных групп в линейных фосфатных полимерах. Несомненно, к таким полимерам может быть отнесена и ДНК. Прямым доказательством связи уранил-иона с фосфатными группами явились данные по изучению ИК спектров поглощения растворов ДНК в присутствии и в отсутствие солей уранила⁷⁵.

ИК спектр поглощения ДНК представлен на рис. 4. Полосы 900—1300 cm^{-1} относят⁸² к колебаниям внутри фосфатных групп и сахаров, сильные полосы 1500—1600 cm^{-1} — к колебаниям групп $>C=N-$, $>C=O$ и $>C=C<$ азотистых оснований, полосы 3000—3500 cm^{-1} — к колебаниям амино- и гидроксильных групп в местах водородных связей⁸³.

При комплексообразовании с уранил-ионом некоторые сдвиги в положении полос наблюдались только в области от 900 до 1300 cm^{-1} . Однако следует отметить, что при сравнении ИК спектра ДНК со спектром комплекса ДНК — железо⁸⁴, также обнаружены только сдвиги полос валентных колебаний фосфорноэфирных групп и не наблюдались сдвиги в области колебаний групп $>C=N-$, $>C=O$ и $>C=C<$ оснований. Между тем, методом дифференциальной спектрофотометрии в УФ области (спектры растворов комплекса металл — ДНК снимались по отношению к растворам свободных лиганда и металла⁸⁵), найдено, что ионы железа взаимодействуют также и с основаниями ДНК⁸⁴. Аналогичным образом, при сравнении ИК спектров аденоциантирифосфорной кислоты (АТФ) и комплексов медь — АТФ не обнаружены сдвиги в области колебаний хромофорных групп оснований. В дифференциальном же спектре наблюдается сдвиг полосы поглощения АТФ в УФ области, который можно объяснить только взаимодействием ионов меди с основаниями⁸⁵. Возможность координации между ионами меди и пуриновой компонентой ДНК установлена также при изучении влияния нуклеиновых кислот и их компонентов на реакцию окисления аскорбиновой кислоты, катализируемую ионами меди⁸⁶.

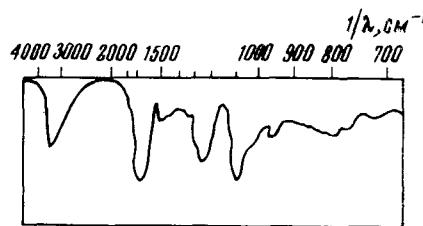


Рис. 4. ИК спектр ДНК тимуса теленка (натриевая соль)

По-видимому, в настоящее время метод ИК спектроскопии еще не в состоянии однозначно ответить на вопрос об участках связи металлов с нуклеиновыми кислотами.

Изучая спектры поглощения растворов ДНК в ближней УФ области в присутствии ионов различных металлов, можно также сделать заключение об участках связывания металлов с ДНК. Известно⁸⁷, что добавление ионов Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} не изменяет положения полос в спектре

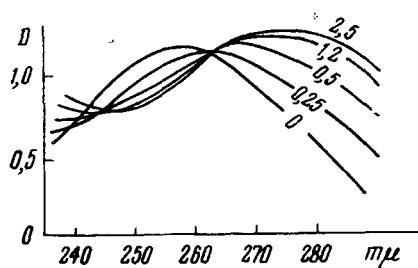
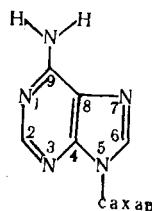


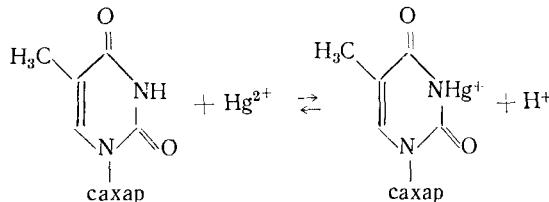
Рис. 5. Влияние $HgCl_2$ на спектр поглощения растворов ДНК тимуса теленка в 0,1 M $NaClO_4$, pH 5,6–5,7 при различном отношении молей $HgCl_2$ к молям фосфора ДНК (r).

На кривых указаны значения r

В том случае, когда комплексообразование не сопровождается освобождением ионов водорода, предполагается⁵⁵, что ион металла присоединяется к электронной паре N-7 или N-3 пуринов аденоцина или гуанозина. Водородные связи при этом не нарушаются.



В случае выделения ионов водорода можно предположить, что идут реакции типа

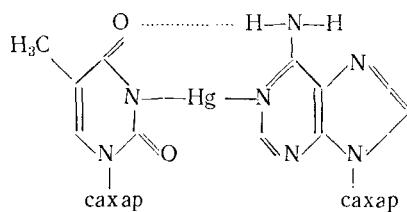


сопровождающиеся разрывом водородных связей.

Рассматривая реакцию между ионами ртути и ДНК, Кац^{89, 90} предполагает, что в области $0 \leq r \leq 0,5$ происходит образование соединений, в которых ртуть играет роль промежуточного моста между двумя витками двойной спирали ДНК, водородные связи которой не полностью нарушены:

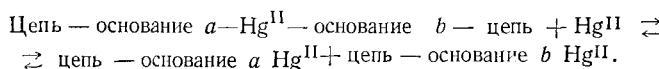
поглощения ДНК, напротив, ионы Hg^{2+} или Ag^{+} сдвигают полосы поглощения, как это видно из рис. 5⁵⁵.

В связи с этим предполагается^{55, 88}, что ионы ртути и серебра связываются с ДНК с помощью азотистых оснований. В зависимости от величины r (отношение $[Hg^{2+}]/[PO_4^{3-}]$) это взаимодействие протекает как с выделением ионов водорода, так и без их выделения^{55, 88}. Это объясняется присоединением ионов металлов к различным основаниям ДНК. При этом водородная связь между цепями может нарушаться или оставаться неизменной.



Такой комплекс представляет собой двухнитевый полинуклеотид, в котором почти все основания данной нити соединены с основаниями другой нити с помощью мостиков из атомов ртути. Состав такого комплекса отвечает отношению ртути к нуклеотиду, равному 1:2.

При $r \geq 0,5$ нити разделяются с образованием комплексов состава 1:1 по реакциям:



Заключение о связи металлов с основаниями нуклеиновых кислот можно сделать при изучении УФ спектров лишь в том случае, если сдвиг максимума полосы поглощения нуклеиновой кислоты в результате действия металла четко выражен, как это имеет место для ионов серебра и ртути; в противном случае следует обращаться к изучению дифференциальных спектров в УФ области⁸⁵.

Имеются основания полагать, что все перечисленные выше методы определения строения комплекса металл—ДНК не дают однозначных результатов. Казалось бы, не вызывало сомнения, что ионы щелочноzemельных металлов связываются с ДНК через фосфатные группы. Однако при использовании метода равновесного диализа⁶⁵ показано, что ионы Mg^{2+} ведут себя различно по отношению к денатурированной и нативной формам ДНК. В связи с этим высказано предположение^{54, 91–93}, что нельзя отвергать возможность связывания Mg^{2+} с основаниями, главным образом пуриновыми, напоминающими по строению 8-оксихинолин, большое сродство которого к магнию хорошо известно.

Показано⁹³, что добавление Mg^{2+} или Ca^{2+} к неионизированным нуклеозидтрифосфатам вызывает такой же спектральный сдвиг какнейтрализация их с помощью OH^- . Вероятно, в обоих случаях вытесняются протоны из кольца.

Предполагается⁹³, что вследствие спиралеобразной конфигурации нуклеозидтрифосфата возможно образование связей между магнием и обеими участками нуклеотида — фосфатной группой и основанием.

Конформационный анализ, проведенный с помощью стюардовских моделей атомов для случая нуклеотид — железо⁹⁴, также подтверждает возможность образования связей одновременно между металлом, фосфатной группой и основанием.

Вполне вероятно, что ионы металлов образуют связи не с отдельными атомами кольца оснований, а со всей молекулой основания в целом; при этом происходит перекрывание молекулярных орбит основания и орбит металла. Можно полагать, что в некоторых случаях образуются соединения типа комплексов с переносом заряда с использованием как орбит металла, так и молекулярных орбит оснований и d -орбит атомов фосфора.

6. Прочность комплексных соединений металлов с ДНК

Некоторые представления о прочности образующихся соединений можно получить, сравнивая величины их констант ассоциации. В табл. 4 приведены значения определенных до настоящего времени констант ассоциации комплексов ДНК с различными металлами. Как видно из табл. 4, для различных металлов резких различий в величинах констант ассоциации не наблюдается.

ТАБЛИЦА 4

Константы ассоциации комплексов металлов с ДНК

Комплекс ДНК с ионом металла	Метод определения равновесной концентрации металла	pH	Ионная сила	Константа ассоциации	Ссылки на литературу
Mg^{2+}	Равновесный диализ		0,2	$2 \cdot 10^2$	65
Mg^{2+}	Металл-индикаторный (эриохром-черный Т)	10	0,002	$2 \cdot 10^5$	97
UO_2^{2+}	Титрование ферроцианидом	3,5	0	$8 \cdot 10^6$	75
Ag^+	Потенциометрический	5,6	0,1	$k_1 2,4 \cdot 10^6$	88
Ag^+	То же	5,6	0,1	$k_2 3,4 \cdot 10^5$	88
Fe^{3+}	Кинетический	3,1	~0	$1,3 \cdot 10^5$	95

На примере комплексов серебра (табл. 5) видно, что происхождение ДНК мало сказывается на величинах констант ассоциации.

При расчете констант предполагалось, что образование связи на каждом участке не зависит от занятости или незанятости других участков. В работе⁹⁵ принимали, что состав комплекса отвечает отно-

ТАБЛИЦА 5

Константы ассоциации комплексов Ag с ДНК из различных источников⁹⁸

Образец ДНК	k_1 $0 < r < 0,2$	k_2 $0,2 < r < 0,5$
Calf thymus ДНК 1 нативн.	$2,1 \cdot 10^6$	$4,1 \cdot 10^4$
Calf thymus ДНК 2 нативн.	$2,2 \cdot 10^6$	$7,4 \cdot 10^4$
Calf thymus ДНК 2 денатур.	$4,2 \cdot 10^6$	$1,3 \cdot 10^5$
<i>E. Coli</i>	$2,2 \cdot 10^6$	$5,7 \cdot 10^4$
<i>M. Lysodeikticus</i>	$3,1 \cdot 10^6$	$2,4 \cdot 10^5$

висит от температуры, и, следовательно, тепловой эффект реакции невелик. На этом основании рассчитана величина энтропии при реакции комплексообразования, равная примерно 23 энтропийным единицам. Положительное изменение энтропии объяснено дегидратацией ионов в процессе комплексообразования.

Как указывалось выше, ионы металлов, в особенности переходных, могут координироваться одновременно со многими функциональными группами, причем для каждой группы константа устойчивости будет другой. Поэтому приведенные константы ассоциации часто являются усредненными величинами.

* * *

Длительное время было распространено мнение, что нахождение металлов в нукleinовых кислотах вызвано случайными загрязнениями. Из настоящего обзора видно, что металлы могут взаимодействовать с

шению металла к нуклеотиду, равному 1:1. В остальных работах число связывающихся участков нуклеиновой кислоты и константу ассоциации определяли графическим методом, общий принцип которого для случая полизелектролитов приведен в работе⁹⁶.

Для комплекса железо-ДНК показано⁹⁵, что константа равновесия мало за-

нуклеиновыми кислотами, причем образующиеся соединения часто обладают свойствами, отличными от свойств исходных кислот.

Одним из наиболее интересных свойств, характеризующих комплексообразование нуклеиновых кислот с металлами, является обратимость изменений структуры нуклеиновых кислот, вызываемая координацией с металлами. Предполагается, что обратимость вообще характерна для поведения двухнитевых, связанных водородной связью полинуклеотидов⁹⁸. При больших концентрациях металла это взаимодействие происходит до полного разделения нитей спирали ДНК и образования комплексов состава 1:1. Этот вид разделения цепей отличен от термического разделения тем, что полностью исключаются химические повреждения структурной целостности ДНК (освобождение пуринов, разрыв эфирнофосфатной связи и т. п.).

Изучение спектров поглощения нуклеиновых кислот в присутствии $HgCl_2$ показало⁵⁶, что, в отличие от ДНК, у РНК наблюдается образование комплекса при $r > 1,0$. Такое же явление было обнаружено в опытах с ДНК, денатурированной нагреванием⁵⁵. Поэтому предполагается⁵⁶, что реакцию с $HgCl_2$ можно использовать также для обнаружения различий между однонитевыми и двунитевыми полинуклеотидами.

Пока найдено только несколько ионов металлов (Hg^{2+} , Ag^+ , по-видимому, Fe^{3+}), которые способны оказывать такое обратимое действие на нуклеиновые кислоты. Вероятно, поиски обратимых реакций для других ионов металлов могут дать интересные результаты.

Необходимой предпосылкой таких исследований должно быть определение участков связывания металлов с нуклеиновыми кислотами. Как следует из приведенного обзора, пока нет однозначных доказательств связи металла с какими-нибудь определенными участками.

Важность изучения комплексообразования нуклеиновых кислот с металлами мы видим также в возможности получения особо чистых препаратов этих веществ. Для этой цели необходимо иметь количественные характеристики комплексообразования — сведения о константах ассоциации соответствующих комплексов. Как мы видели, эти сведения пока крайне отрывочны. Кроме того, требует дальнейшего подтверждения и обоснования тот факт, что для таких разных ионов металлов, как Mg^{2+} , UO^{22+} , Ag^+ , Fe^{3+} , константы ассоциации оказались близкими по величине.

ЛИТЕРАТУРА

1. С. Е. Бреслер, Введение в молекулярную биологию, Изд. АН СССР, М., 1963.
2. F. H. Crick, J. D. Watson, Proc. Royal Soc. (London), **A233**, 80 (1954).
3. А. С. Спирин, Л. П. Гаврилова, А. Н. Белозерский, ДАН, **125**, 658 (1959).
4. А. С. Спирин, Л. П. Гаврилова, С. Е. Бреслер, М. И. Мосевицкий, Биохимия, **24**, 938, (1959).
5. A. S. Spiegel, J. Mol. Biol., **2**, 436 (1960).
6. А. С. Спирин, Ж. ВХО им. Менделеева, **6**, 260 (1961).
7. K. Fujiwara, W. E. C. Wacker, R. Driguian, A. F. Bartholomay, B. J. Vallee, Proc. Natl. Acad. Sci., US, **46**, 1298 (1960).
8. S. Rice, P. Doty, J. Am. Chem. Soc., **79**, 3937 (1957).
9. R. A. Cox, U. Z. Littauer, Nature, **184**, 818 (1959).
10. В. Магазеник, в сб. Нуклеиновые кислоты, М., ИЛ, 1956.
11. B. D. Hall, P. Doty, J. Mol. Biol., **1**, 111 (1959).
12. H. Boedtker, Biochim. Biophys. Acta, **32**, 519 (1959).
13. Э. Чарграфф, Д. Дэвидсон, Нуклеиновые кислоты, М., ИЛ, 1957.
14. R. W. Halley, V. A. Lazar, J. Biol. Chem., **236**, 1446 (1961).
15. C. Neuberg, I. S. Roberts, Arch. Biochem. Biophys. **20**, 185 (1949).
16. C. A. Zittle, J. Biol. Chem., **163**, 111 (1946).

17. J. Feldman, J. R. Havill, W. F. Neuman, Arch. Biochem. Biophys., **46**, 443 (1953).
18. L. F. Cavalieri, A. Angelos, M. E. Balis, J. Am. Chem. Soc., **73**, 4902 (1951).
19. L. F. Cavalieri, Там же, **74**, 1242 (1952).
20. C. A. Thomas, Там же, **76**, 6032 (1954).
21. S. Katz, Там же, **74**, 2938 (1952).
22. G. Jungnarr, Science, **113**, 378 (1951).
23. H. S. Loring, R. S. Waritz, Там же, **125**, 646 (1957).
24. H. S. Loring, S. Al-Rawi, Y. Fujimoto, J. Biol. Chem., **233**, 1415 (1958).
25. H. S. Loring, Y. Fujimoto, L. F. Eng, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., **45**, 287 (1959).
26. J. S. Viberg, W. F. Neuman, Arch. Biochem. Biophys., **72**, 66 (1957).
27. J. Erkama, P. Suutarinen, Acta Chem. Scand., **13**, 323 (1959).
28. W. E. C. Wacker, B. J. Vallee, Federation Proc., **18**, 345 (1959).
29. W. E. C. Wacker, B. J. Vallee, J. Biol. Chem., **234**, 3257 (1959).
30. K. S. Kirby, Biochem. J., **66**, 495 (1957).
31. P. O. P. Ts'o, J. Vopner, J. Vinograd, Biochem. Biophys. Acta, **30**, 570 (1958).
32. M. G. Hamilton, M. L. Petermann, J. Biol. Chem., **234**, 1441 (1951).
33. Б. И. Гольдштейн, В. В. Герасимова, Вопросы геронтологии и гериартирии, М., **1962**, 20.
34. В. И. Иванов, Биофизика, **10**, 11 (1965).
35. Б. И. Гольдштейн, Д. В. Волькензон, Л. Г. Кондратьева, Н. Д. Ульянова, Биохимия, **15**, 1731 (1950).
36. F. C. Chao, H. K. Schachman, Arch. Biochem. Biophys., **61**, 220 (1956).
37. F. C. Chao, Там же, **70**, 426 (1957).
38. A. Tissiers, J. D. Watson, Nature, **182**, 778 (1958).
39. D. Mazia, Proc. Natl. Acad. Sci. US, **40**, 521 (1954).
40. D. Steffensen, Genetics, **42**, 239 (1957).
41. D. Steffensen, Proc. Natl. Acad. Sci. US, **39**, 613 (1953).
42. S. Wolf, H. E. Luippold, Proc. Natl. Acad. Sci. US, **42**, 510 (1956).
43. R. A. Eversol, E. L. Tatum, Там же, **42**, 68 (1956).
44. B. B. Hyde, R. L. Paliwal, Am. J. Botany, **45**, 433 (1958).
45. R. J. Wojnar, J. S. Roth, Biochim. Biophys. Acta, **87**, 17 (1964).
46. S. Nishimura, G. D. Navelli, Biochim. Biophys. Res. Comm., **11**, 161 (1963).
47. F. C. Chao, B. S. Friesen, R. C. Sinsheimer, Proc. Natl. Acad. Sci. US, **45**, 305 (1959).
48. R. Haschemeyer, B. Singer, C. H. Fraenkel, Там же, **45**, 313 (1959).
49. R. A. Brown, Там же, **47**, 465 (1961).
50. I. A. V. Butler, B. E. Conway, D. W. F. James, Trans. Faraday Soc., **50**, 612 (1954).
51. W. F. Dove, N. Davidson, J. Mol. Biol., **5**, 467 (1962).
52. L. Kotin, Там же, **7**, 309 (1963).
53. G. L. Eichgorn, Nature, **194**, 474 (1962).
54. G. L. Eichgorn, P. Clark, Proceedings of seventh International Conference of Coordination Chemistry, Abstracts, Stockholm, 1962, стр. 126.
55. T. Yamane, N. Davidson, J. Am. Chem. Soc. **83**, 2599 (1961).
56. S. Katz, V. Santilly, Biochim. Biophys. Acta, **55**, 621 (1962).
57. W. F. Dove, T. Yamane, Biochim. Biophys. Res. Comm., **3**, 608 (1960).
58. Б. И. Гольдштейн, В. В. Герасимова, Укр. биохим. ж., **35**, 3 (1963).
59. E. Hammarsten, Biochem. Ztschr. **144**, 383 (1924).
60. E. Hammarsten, T. Teorell, Act. Med. Scand., **68**, 226 (1926).
61. T. Casperson, E. Hammarsten, H. Hammarsten, Trans. Faraday Soc., **31**, 367 (1935).
62. K. G. Stern, M. A. Steinberg, Biochim. Biophys. Acta, **11**, 553 (1953).
63. J. Shack, R. J. Jenkins, J. M. Thompson, J. Biol. Chem., **198**, 85 (1952).
64. J. Shack, R. J. Jenkins, J. M. Thompson, Там же, **203**, 373 (1953).
65. G. Zubay, P. Doty, Biochim. Biophys. Acta, **29**, 47 (1958).
66. G. Zubay, Там же, **32**, 233 (1959).
67. G. Felsenfeld, S. Huang, Там же, **34**, 234 (1959).
68. G. Felsenfeld, S. Huang, Там же, **37**, 425 (1960).
69. G. Felsenfeld, D. R. Davies, A. Rich, J. Am. Chem. Soc., **79**, 2023 (1957).
70. G. Felsenfeld, A. Rich, Biochim. Biophys. Acta, **26**, 457 (1957).
71. R. C. Warner, J. Biol. Chem., **229**, 711 (1957).
72. A. Rich, D. R. Davies, J. Am. Chem. Soc., **78**, 3548 (1956).
73. G. Felsenfeld, Biochim. Biophys. Acta, **29**, 133 (1958).
74. G. Felsenfeld, S. Huang, Там же, **51**, 19 (1961).
75. C. R. Zobel, M. Beer, J. Biophys. Biochem. Cytology, **10**, 335 (1961).
76. K. C. Banerjee, D. I. Perkins, Biochim. Biophys. Acta, **61**, 1 (1962).
77. J. Eisinger, R. G. Shulman, B. M. Szymanski, J. Chem. Phys., **36**, 1721 (1962).

78. B. Singer, *Biochim. Biophys. Acta*, **80**, 137 (1964).
79. D. F. Bradley, G. Felsenfeld, *Nature*, **185**, 1920 (1959).
80. S. Watanabe, L. Evenson, J. Guhl, *J. Biol. Chem.*, **238**, 324 (1963).
81. C. Ropars, R. Viovy, *C. r.*, **257**, 3499 (1963).
82. E. R. Blout, H. Lenormant, *Biochim. Biophys. Acta*, **17**, 325 (1953).
83. E. R. Blout, M. Fields, *J. Biol. Chem.*, **178**, 335 (1949).
84. К. Б. Яцимирский, Е. Е. Крисс, Т. И. Ахрамеева, А. С. Сегеда, Реф. докладов на IX Менделеевском съезде по общей и прикл. химии. Секция химии и технол. природных соединений. Изд. «Наука», М., 1965, стр. 287.
85. P. W. Schneider, H. Brüntzing, H. Eglenmeyer, *Helv. Chim. Acta*, **47**, 992 (1964).
86. E. Frieden, J. Alles, *J. Biol. Chem.*, **230**, 797 (1958).
87. B. Singer, H. Fraenkel-Conrat, *Biochemistry*, **1**, 852 (1962).
88. T. Yamane, N. Davidson, *Biochim. Biophys. Acta*, **55**, 609 (1962).
89. S. Katz, *Nature*, **194**, 569 (1962).
90. S. Katz, Там же, **195**, 997 (1962).
91. J. J. Blum, *Arch. Biochem. Biophys.*, **55**, 486 (1955); **87**, 104 (1960).
92. B. H. Leventhal, T. V. James, *Biochim. Biophys. Acta*, **21**, 298 (1956).
93. K. Hotta, J. Bramms, M. F. Morales, *J. Am. Chem. Soc.*, **83**, 997 (1961).
94. Б. И. Гольдштейн, В. В. Герасимова, *Укр. биох. ж.*, **37**, № 6 (1965).
95. Е. Е. Крисс, К. Б. Яцимирский, *Ж. неорг. хим.*, **10**, № 11 (1965).
96. J. T. Edsall, J. Wiman, *Biophysical Chemistry*, Academic Press, N. Y. 1958, т. 1, стр. 616.
97. J. Shack, B. S. Bynum, *Nature*, **184**, 635 (1959).
98. T. Yamane, N. Davidson, *Biochim. Biophys. Acta*, **55**, 780 (1962).

Ин-т общей и неорганической химии АН УССР