

УДК 539.121.42

## СПИНОВЫЕ МЕТКИ\*

*К. Л. Гамильтон и Г. М. Макконнелл*

## ОГЛАВЛЕНИЕ

|  |     |
|--|-----|
| I. Введение . . . . .  | 531 |
| II. Химия иминоксильных радикалов . . . . .                              | 533 |
| III. Спектры ЭПР иминоксильных радикалов . . . . .                       | 536 |
| IV. Вещества, применяемые в качестве спиновых меток . . . . .            | 542 |
| V. Спектры ЭПР спиновых меток, присоединенных к макромолекулам . . . . . | 545 |
| VI. Спин-меченые аллостерические белки . . . . .                         | 549 |
| VII. Спин-меченые кристаллы белков . . . . .                             | 555 |

## I. ВВЕДЕНИЕ

Спектр электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) свободных радикалов зависит от свойств окружающей среды. Если имеет место анизотропное сверхтонкое электрон-ядерное и (или) спин-орбитальное взаимодействие, то движение радикала относительно неподвижной системы координат может влиять на форму линий спектра ЭПР. Электростатические взаимодействия с соседними молекулами приводят к изменению электронной структуры, перераспределению спиновой плотности и тем самым к изменению сверхтонкой структуры спектра ЭПР. Обменные и магнитные дипольные взаимодействия со спинами неспаренных электронов других парамагнитных частиц, а также дипольные взаимодействия с окружающими ядрами тоже видоизменяют спектр ЭПР. За последнее десятилетие все эти явления были предметом интенсивного количественного исследования химиков и физиков. В этой области и связанных с ней теориях электронной структуры молекул, распределения спиновой плотности, электронной и ядерной магнитной релаксации, а также в области усовершенствования радиоспектроскопической техники достигнуты поистине выдающиеся результаты.

Поскольку лишь пренебрежимо малая часть компонентов биологических систем парамагнитна, спектры ЭПР свободных радикалов, введенных в биологические системы, не испытывают влияния со стороны собственных парамагнитных частиц и адекватно отражают свойства введенных парамагнитных молекул и их окружения. В нашей лаборатории разработан метод применения стабильных свободных органических радикалов — „спиновых меток” для изучения структуры, функций и химизма биологических систем.

Метод спиновых меток предложен сравнительно недавно, поэтому полноценный обзор мог бы показаться преждевременным. С другой стороны, уже сейчас ясно, что приложения метода столь многочисленны и

---

\* Перев. с англ. М. Г. Гольдфельда. Обзор из сб. «Structural chemistry and molecular Biology». London, 1968.

разнообразны, что скоро станет невозможным дать исчерпывающее и связанное описание этой области. Настоящий обзор преследует цель подвести некоторый итог текущим и недавним работам нашей лаборатории, а также указать возможное направление дальнейших исследований.

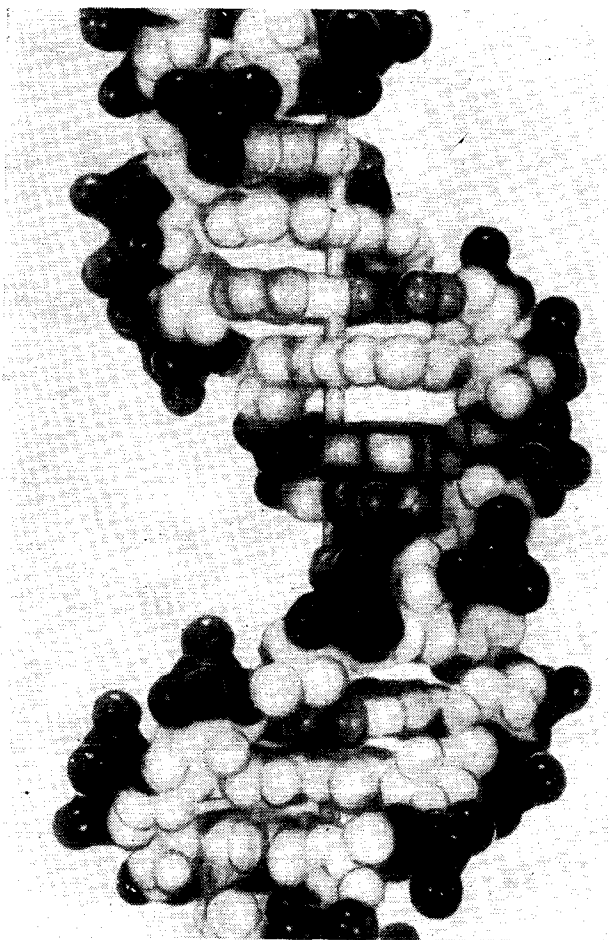
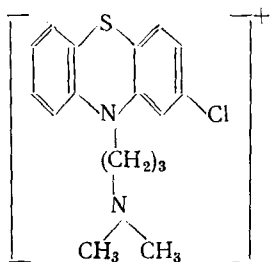


Рис. 1. Молекулярная модель фрагмента двойной спирали ДНК. Показано внедрение ион-радикала хлорпромазина

«Спиновую метку» мы определяем как синтетический органический свободный радикал, который можно включить внутрь макромолекулы или присоединить к той или иной молекуле или системе молекул, представляющей интерес для биологии, для того чтобы получить информацию о структуре, конформационных изменениях или химических реакциях. Для определенности мы исключаем из рассмотрения парамагнитные ионы металлов, равно как и собственные свободные радикалы, например, радикалы, возникающие в биологических системах в процессах переноса электронов. Наибольшие практические трудности при подборе спиновых меток связаны с тем фактом, что почти все органические свободные радикалы чрезвычайно реакционноспособны, особенно в водных растворах, в условиях, близких к физиологическим. В качестве первой спино-

вой метки в нашей работе был использован катион-радикал хлорпромазина.



с помощью которого мы исследовали внедрение ароматических молекул в нативную двойную спираль ДНК. Сверхтонкое взаимодействие и анизотропия  $g$ -фактора этого радикала достаточно велики, чтобы связывание с ДНК могло оказать значительное влияние на спектр ЭПР. Из наблюдений ЭПР меченых молекул ДНК, ориентированных в потоке, удалось сделать вывод, что плоскость ароматического кольца ион-радикала действительно почти перпендикулярна оси спирали, как это показано на модели (рис. 1) <sup>1</sup>. Однако у ион-радикала хлорпромазина как спиновой метки много недостатков. В водных растворах он не вполне устойчив, его стабильность зависит от pH; сверхтонкая структура спектра ЭПР настолько сложна, что количественный анализ формы линии весьма затруднен или невозможен.

Большая часть успехов метода спиновых меток связана с применением исключительно стабильных нереакционноспособных иминоксильных радикалов\*, имеющих спектр ЭПР с очень простой сверхтонкой структурой. Свойства этих радикалов настолько важны для приложений метода, что будет уместно дать достаточно подробный обзор химии этих соединений, методов их получения и использования в качестве спиновых меток.

## II. ХИМИЯ ИМИНОКСИЛЬНЫХ РАДИКАЛОВ

Ди-трет.-алкилиминоксилы обладают свойствами, делающими их идеальными «спиновыми метками». Первым в этом ряду был синтезирован ди-трет.-бутилиминоксил (I)\*\*:



Это соединение можно очистить фракционной перегонкой или методом газо-жидкостной хроматографии при 118° без разложения <sup>2</sup>. Его растворы в органических растворителях, воде, водной щелочи устойчивы и не взаимодействуют с кислородом. Вскоре после первого синтеза в ряду иминоксильных соединений было показано, что функциональная группа, включенная в

\* Авторы называют эти радикалы нитроксидами, что противоречит правилам официальной номенклатуры органических соединений. В советской литературе получил распространение термин «иминоксилы». (Прим. перев.)

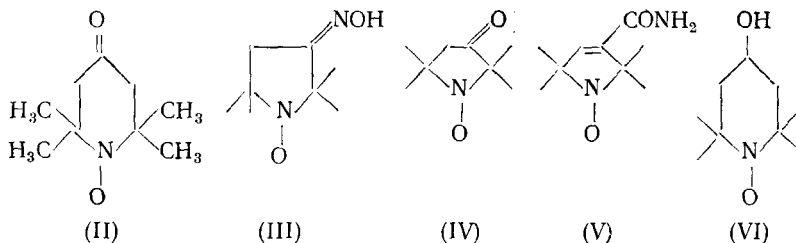
\*\* Первый радикал этого класса был синтезирован в СССР в 1959 г. <sup>83</sup> (Прим. перев.)

молекулу, содержащую иминоксильный фрагмент, может вступать в реакции, не затрагивающие неспаренный электрон<sup>3</sup>. Затем последовали обширные исследования в области синтеза и свойств различных стабильных иминоксидов.

Ди-*трет*-бутилиминоксил (I) был получен по реакции *трет*-нитробутана с металлическим натрием<sup>2,4</sup>, *трет*-бутиллитием<sup>5</sup> и избытком *трет*-бутилмагнийхлорида в присутствии металлического магния<sup>6</sup>. Путем термического разложения подходящих азосоединений в присутствии 2-нитрозо-2-метилпропана были синтезированы некоторые замещенные аналоги ди-*трет*-бутилиминоксила<sup>7</sup>.

Наиболее распространенный метод синтеза включает стадию окисления соответствующего циклического вторичного амина. Радикал 2,2,6,6-тетраметил-4-оксопиперидин-1-оксил (II) был впервые получен в индивидуальном состоянии при действии на соответствующий амин окисью серебра<sup>8</sup>, но более удобным оказалось окисление перекисью водорода в присутствии катализатора. В качестве катализаторов при получении многих иминоксидов с различными функциональными группами используют вольфрамат натрия с трилоном Б и фосфорновольфрамовую кислоту<sup>3,8-10</sup>. Скорость реакции в присутствии фосфорновольфрамовой кислоты, по-видимому, значительно больше, чем с вольфраматом натрия<sup>11</sup>, но выход при этом иногда уменьшается. Например, сообщалось, что окисление 2,2,6,6-тетраметилпиперидина в присутствии вольфрамата натрия дает выход 70% от теоретического<sup>8</sup>, тогда как с фосфорновольфрамовой кислотой выход составляет 54%<sup>11</sup>. 2,2,5,5-тетраметил-3-карбамидопирролин-1-оксил образуется с выходом 92% при окислении соответствующего амина в присутствии как вольфрамовой, так и фосфорновольфрамовой кислот<sup>10,11</sup>.

Разумеется, на выбор функциональных групп, совместимых с образованием иминоксила, накладываются определенные ограничения. В частности, циангруппа в условиях образования иминоксильного фрагмента переходит в амидную<sup>9,10</sup>. Окисление 2,2,5,5-тетраметил-3-амино-



пирролидина приводит к соответствующему оксим-иминоксилу (III)<sup>9,10</sup>. Попытка получить парамагнитные продукты путем каталитического окисления 2,2,5,5-тетраметил-3-оксопирролидина (IV) вольфраматом натрия в присутствии ЭДТА оказалась безуспешной. Однако отмечалось<sup>12</sup>, что при использовании в качестве катализатора фосфорновольфрамовой кислоты образуется радикальный продукт, который не удалось выделить из реакционной смеси.

Иминоксил (IV) можно успешно получать окислением его оксима или семикарбазона с последующим гидролизом<sup>10,12</sup> или по реакции Гофмана из 2,2,5,5-тетраметил-3-карбамидопирролин-1-оксида<sup>9</sup>. Розанцев и Криницкая<sup>10</sup> установили, что попытка окисления 2,2,5,5-тетраметил-3-оксипирролидина приводит к размыканию гетероцикла. Шестичленный гетероциклический спирт 2,2,6,6-тетраметил-4-оксопиперидин (VI), однако, легко превращался в соответствующий иминоксил в присутствии

катализатора<sup>11, 13</sup>, также как и триацетонамин\* (неопубликованные данные нашей лаборатории).

Синтезированные стабильные иминоксилы с функциональными группами могут вступать в разнообразные реакции без затрагивания неспаренного электрона. С их помощью получены производные кетонов<sup>3, 8</sup> и спиртов<sup>11, 14</sup>. Амиды-радикалы с помощью этих реакций можно гидролизовать до соответствующих кислот или дегидратировать с образованием радикал-нитрилов<sup>9, 10</sup>. Было показано также, что этерификация карбоксипроизводного иминоксила диазометаном идет количественно, без потерь парамагнитного продукта<sup>10</sup>. Паранитрофенол<sup>15</sup> и имидазол<sup>16</sup> ацилируются аминоксил-кислотами в присутствии дициклогексилдикарбодиимида в качестве активатора ацилирования. Точно так же аминопроизводные иминоксильных радикалов можно ацилировать<sup>16-19</sup>, алкилировать<sup>20</sup> и включать в N-алкилмалеимида<sup>16, 18</sup>, а также переводить в изоцианаты<sup>21</sup>. Иминоксильная группа сохраняется при реакции 2,2,6,6-тетраметил-4-оксопиперидин-1-оксида (II) с *трет*-бутилатом калия и диалкилсукцинатами в процессе конденсации по Штоббе<sup>22</sup>. Иминоксильная часть радикала не затрагивается и при действии реактива Гриньяра по карбонилу в II<sup>8, 11</sup>.

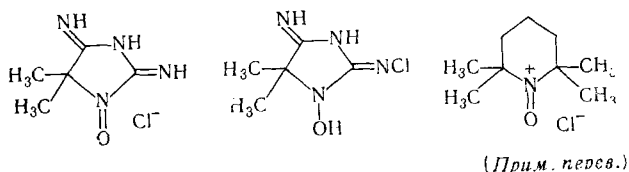
Следует помнить, однако, что иминоксилы, будучи свободными радикалами, во многих случаях энергично взаимодействуют со многими реагентами с затрагиванием неспаренного электрона. Особенно легко идут реакции окисления и восстановления. Для ди-*трет*-бутилиминоксила одноэлектронные окислительно-восстановительные потенциалы, измеренные полярографически в ацетонитриле, составляют соответственно 0,55 и —1,63 в<sup>2</sup>. Каталитическое гидрирование переводит иминоксил в соответствующий гидроксиламин<sup>2, 3, 23</sup>\*\* или амин, в зависимости от условий. Гидроксиламин легко образуется при обработке радикала фенилгидразином<sup>14, 23</sup>. Кислород воздуха легко вновь окисляет гидроксиламины до иминоксидов<sup>2, 14</sup>. Интересно, что реагенты с объемистыми группами атомов, такие, как изопропилат алюминия, можно использовать для восстановления кето-иминоксидов до вторичных спиртов<sup>10, 16</sup> без существенного затрагивания парамагнитного центра.

Молекулы, меченные иминоксидом, обратимо реагируют с дитионатом натрия с образованием диамагнитных веществ, медленно и необратимо переходящих в неидентифицированные продукты<sup>16</sup>. Хотя ди(трифторметил)-иминоксил образует аддукт с газообразной окисью азота<sup>24</sup>, тетраметилированные гетероциклические радикалы, по-видимому, с нею не взаимодействуют\*\*\*. Так, спектр ЭПР N-(2,2,6,6-тетраметил-1-оксил-4-пиперидил)-малеимида в водном растворе при обработке окисью азота, очищенной от кислорода, не изменяется<sup>25</sup>. О степени устойчивости иминоксильной группы в кислотах опубликовано мало сведений, за исключением того, что безводный хлористый водород переводит ди-*трет*-

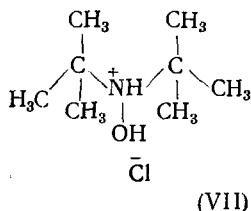
\* Этот метод был разработан в СССР<sup>84, 85</sup>. (Прим. перев.)

\*\* См. также<sup>86</sup>. (Прим. перев.)

\*\*\* Интересно, что азотоксис и иминоксилы энергично взаимодействуют с хлором и бромом; при этом могут быть изолированы соответствующие диамагнитные аддукты, например,

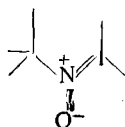


бутилиминоксил (I) в гидрохлорид ди-*трет*.-бутилгидроксиламина (VII):

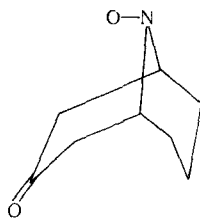


После нейтрализации водной щелочью VII переходит в гидроксил-амин, из которого можно снова получить I<sup>2</sup>. В течение небольшого времени растворы веществ, содержащих нитроксильную группу, могут сохраняться в водной среде при pH 1, но в целом устойчивость при этих условиях для иминоксильных радикалов не характерна (неопубликованные данные лаборатории авторов) \*.

Незначительная реакционная способность ди-*трет*.-алкилиминоксилов требует некоторых пояснений. Предполагают, что за устойчивость к димеризации ответственны стабильность, присущая трехэлектронной связи N—O<sup>26</sup> \*\*, и стерические затруднения, создаваемые *трет*.-алкильными группами<sup>2</sup> \*\*\*. Имеются доказательства того, что разложение иминоксидов включает промежуточную стадию образования нитрониевой группы:

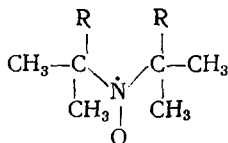


Этот процесс замедляется, когда среди α-заместителей нет легко отщепляемых групп. В γ-оксинорпсевдопелтьерине иминоксильная группа экранирована вторичными атомами углерода, находящимися в голове моста. Этот радикал устойчив в твердом состоянии в бензольном и нейтральном водном растворах<sup>27</sup>.



### III. СПЕКТРЫ ЭПР ИМИНОКСИЛЬНЫХ РАДИКАЛОВ

Спектр ЭПР типичного экранированного иминоксильного радикала



\* См. также<sup>87</sup>. (Прим. перев.)

\*\* См. также<sup>88</sup>. (Прим. перев.)

\*\*\* См. также<sup>89</sup>. (Прим. перев.)

в растворе, при комнатной температуре весьма прост. Сверхтонкая структура (СТС) спектра, связанная с наличием в радикале атома азота, состоит из трех узких компонент, как показано на рис. 4, а. Константа изотропного сверхтонкого взаимодействия  $a_N$  изменяется в небольших пределах в зависимости от структуры остальной части молекулы и природы растворителя<sup>11, 28, 29</sup>. В таблице приведены значения  $a_N$ , полученные для различных иминоксильных радикалов, экранированных метильными группами. Влияние растворителя, показанное на рис. 2, в ряде случаев более существенно, чем влияние структуры самого радикала<sup>11</sup>. Наблюдаемое увеличение сверхтонкого взаимодействия при увеличении полярности растворителя пропорционально  $Z$ -фактору Косовера<sup>30</sup> (эмпирическая постоянная, характеризующая положение полосы переноса заряда иодистого пиридиния) и, вероятно, связано с увеличением отрицательного заряда на атоме кислорода и большей спиновой плотностью на атоме азота<sup>11, 21</sup>.

В ряде случаев в спектрах ЭПР иминоксидов наблюдаются и другие линии СТС. При большом усилении спектр радикала (II) содержит дублеты-сателлиты с расщеплением 21 гс, связанные с примесью изотопа  $^{15}\text{N}$  в природном азоте<sup>11, 29</sup>. Если линии достаточно узки, то каждая из трех главных компонент СТС сопровождается дублетом (с расщеплением 4,5—7 гс), связанным с примесью изотопа  $^{13}\text{C}$  в метильных и кольцевых метиленовых группах<sup>11, 28</sup>.

Фактор электростатического расщепления,  $g$ -фактор, не зависит от структуры радикала<sup>11, 31</sup>, но уменьшается с увеличением полярности растворителя<sup>11</sup>.

Как было отмечено в начале статьи, форма спектра ЭПР радикалов, вообще говоря, зависит от некоторых свойств окружения. Условия биологических экспериментов таковы, что анализ формы линий ЭПР иминоксидов особенно упрощается: биологические системы магнитно разбавлены, опыты проводятся в умеренном интервале температур, сверхтонкое взаимодействие и  $g$ -фактор слабо зависят от растворителя. Все это позволяет анализировать форму линий спектра ЭПР, исходя из влияния локального окружения на подвижность радикала. Для такого анализа необходимо иметь сведения об анизотропии тензоров сверхтонкого взаимодействия и  $g$ -фактора. Они могут быть получены в опытах с монокристаллами.

Парамагнитный резонанс ориентированных монокристаллов (матрицы), содержащих диалкилиминоксиды<sup>31</sup> в качестве примесей, описывается с помощью спин-гамильтониана:

$$\mathcal{H} = |\beta| \mathbf{S} \mathbf{G} \mathbf{H}_0 + h \mathbf{A} \mathbf{S}_z \mathbf{I}_z + h \mathbf{B} \mathbf{S}_x \mathbf{I}_x + h \mathbf{C} \mathbf{S}_y \mathbf{I}_y. \quad (1)$$

В уравнении (1)  $x, y, z$  — главные оси тензора сверхтонкого взаимодействия,  $\mathbf{G}$  — спектроскопический  $g$ -тензор,  $\beta$  — магнетон Бора,  $\mathbf{H}_0$  — вектор внешнего магнитного поля,  $\mathbf{S}$  и  $\mathbf{I}$  — операторы спина электрона и ядра  $^{14}\text{N}$  соответственно в единицах  $\hbar$ . Элементы  $g$ -тензора (для соединения  $\text{I}$ ) таковы:  $g_{xx}=2,0089$ ;  $g_{yy}=2,0061$ ,  $g_{zz}=2,0027$ . Измеренные констан-

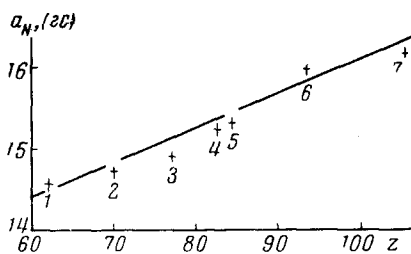
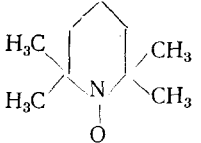
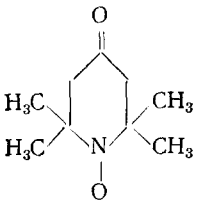
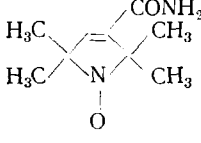
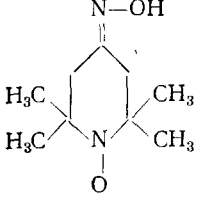
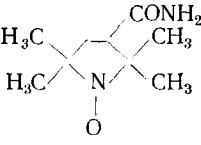
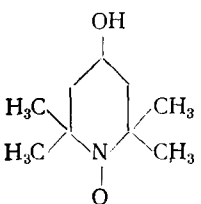
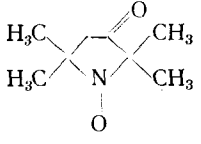
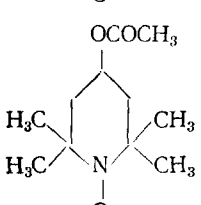
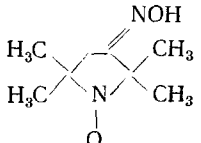
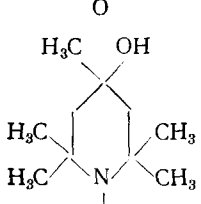
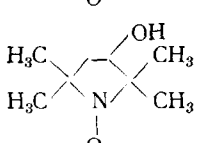
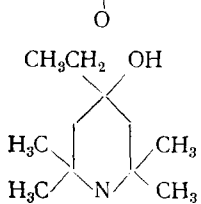
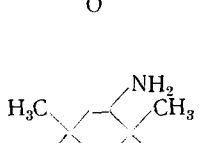
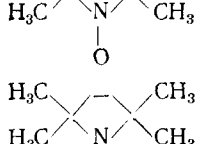
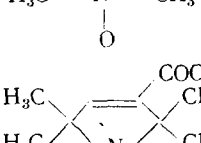


Рис. 2. Зависимость констант сверхтонкого расщепления на атоме азота для 2,2,6,6-тетраметил-4-пиперидин-1-оксида от растворителя. По оси абсцисс — фактор Косовера  $z$  для каждого растворителя<sup>11</sup>:

1 — бензол, 2 — диметилсульфоксид, 3 —  $n$ -бутанол, 4 — формамид; 5 — этиленгликоль; 6 —  $\text{H}_2\text{O}$ ; 7 — 10 M LiCl в  $\text{H}_2\text{O}$

Изотропное сверхтонкое расщепление различных иминоксильных радикалов

| Соединение  | $a_N$ , гс <sup>а</sup>   | Ссылки на литературу    | Соединение  | $a_{N_2}$ , гс <sup>а</sup>                    | Ссылки на литературу |
|---|---|-------------------------|---|--|----------------------|
| $(CH_3)_3CNC(CH_3)_3$   | 15,1 <sup>б</sup>   | 31                      |    | 16,3   | 11, 28               |
|    | 15,1<br>15,3 <sup>в</sup><br>14,3 <sup>б</sup><br>16,1 <sup>в</sup> | 11, 28<br>8<br>31<br>17 |    | 14,9<br>14,0 <sup>б</sup><br>16,0 <sup>в</sup> | 11<br>31<br>11       |
|    | 15,5  | 11, 28                  |    | 16,0 <sup>в</sup>                              | 17                   |
|   | 16,1<br>15,1 <sup>г</sup><br>17,1 <sup>в</sup>                      | 11, 28<br>13<br>17      |    | 14,76  | 29                   |
|  | 15,9  | 11                      |   | 15,01  | 29                   |
|  | 15,96   | 11, 28                  |  | 15,2   | 29                   |
|  | 15,3 <sup>г</sup>   | 13                      |  | 15,6 <sup>д</sup><br>16,2 <sup>е</sup>         | 17<br>17             |
|   |   |                         |  | 15,3   | 29                   |
|   |   |                         |  | 15,8 <sup>ж</sup><br>15,5 <sup>з</sup>         | 16<br>16             |

<sup>а</sup> Измерения проводились в диэтиленгликоле кроме специально оговоренных случаев.

<sup>б</sup> В ди-*т*рет-бутилкетоне.

<sup>в</sup> В воде.

<sup>г</sup> В бензоле.

<sup>д</sup> В воде при pH 1,9.

<sup>е</sup> В воде при pH 11,2.

<sup>ж</sup> В 5% бикарбонате натрия.

<sup>з</sup> В 0,1 N HCl.



ты сверхтонкого взаимодействия  $|A| = 87 \text{ Мгц}$   $|B| \simeq |C| \simeq 14 \div 17 \text{ Мгц}$ . Когда магнитное поле направлено вдоль осей  $z$ ,  $x$  и  $y$ , сверхтонкое расщепление составляет  $32$ ;  $6 \pm 1,5$  и  $6 \pm 1,5 \text{ гс}$  соответственно. Экспериментальное абсолютное значение константы изотропного сверхтонкого взаимодействия  $43 \text{ Мгц}$  (или  $15,5 \text{ гс}$ ) и в соответствии с уравнением (2)

$$|a| = \frac{1}{3} |A + B + C| \quad (2)$$

константы  $A$ ,  $B$ ,  $C$  совпадают по знаку.

Эти результаты в совокупности с некоторыми дополнительными данными, приведенными ниже, позволяют выяснить многие детали, касающиеся молекулярной и электронной структуры иминоксильных радикалов.

В опытах Гриффита и др.<sup>3</sup> радикалы (I) и (II), а также радикальные производные, полученные из IV, вводили в кристаллы тетраметил-1,3-циклобутандиона. Кристаллическая структура этого дикетона известна<sup>32</sup>. Она относится к моноклинической сингонии, элементарная ячейка содержит две магнитно-эквивалентные частицы. Кольцо циклобутана и два атома кислорода лежат в одной плоскости<sup>32</sup>. Так как спектр ЭПР иминоксила (I) в тетраметилциклобутандионе указывает на симметрию, ожидаемую для кристаллической структуры кристалла-хозяина (матрицы), то естественно предположить, что частицы иминоксила включаются в кристалл как ориентированные примеси, замещающие молекулы матрицы в узлах кристаллической решетки. Структура (I), несомненно, допускает ориентированное замещение молекул дикетона.

Другое предположение состоит в том, что азот, кислород и четвертичные атомы углерода расположены в одной плоскости. Таким образом, наши предположения требуют, чтобы одна из осей симметрии была перпендикулярна плоскости циклобутандионового кольца, что и наблюдается. Главная ось  $z$  оказывается перпендикулярной плоскости кольца. Далее из наших предположений следует, что вторая главная ось сверхтонкого взаимодействия направлена по линии кислород — кислород циклобутандиона, что также имеет место (ось  $x$ ). Так как спектры ЭПР (II) и иминоксильного производного (IV) совпадают со спектром (I) в том же кристалле-носителе, те же представления можно применить и к этим радикалам.

Если азот, кислород и два эквивалентных третичных атома углерода находятся в одной плоскости, то неспаренный электрон должен занимать молекулярную  $\pi$ -орбиталь (антисимметричную относительно отражения в плоскости  $xy$ ). Сверхтонкое расщепление на ядре атома  $^{14}\text{N}$  действительно показывает, что неспаренный электрон в значительной мере локализован на  $2p\pi$ -орбиталях атома азота<sup>21</sup>. Примерно аксиальная симметрия сверхтонкого взаимодействия ( $B \simeq C$ ) согласуется с этой картиной. Изотропное сверхтонкое взаимодействие, наблюдаемое для насыщенных иминоксильных (15,5 гс), также весьма близко к значению 19,5 гс, полученному для  $\dot{\text{N}}\text{H}_3$ <sup>33</sup>; изотропное сверхтонкое расщепление, рассчитанное теоретически для плоского фрагмента  $\dot{\text{N}}\text{H}_3$ , составляет 20,9 гс<sup>30</sup>. Исходя из соображений, которые были привлечены для объяснения расщепления на ядрах  $^{13}\text{C}$  в радикале  $\text{CH}_3$ <sup>35</sup>, можно заключить, что  $\dot{\text{N}}\text{H}_3$  и, следовательно, иминоксильные радикалы — плоские. С другой стороны, сколько-нибудь заметный вклад  $s$ -составляющей в орбиту неспаренного электрона привел бы к гораздо большему изотропному расщеплению.

Каррингтон и Лонге-Хиджинс<sup>36</sup> использовали слейтеровскую  $2p\pi$ -орбиталь для расчетов анизотропного сверхтонкого расщепления на ядре атома азота и получили значение 76 Мгц для чисто анизотропного элект-

рон-ядерного дипольного взаимодействия для спинов, ориентированных вдоль оси  $z$ . Приняв спиновую плотность на  $2p\pi$ -орбитали алифатического иминоксила равной  $15,5/19,5=0,80$ , можно оценить расщепление при параллельном направлении магнитного поля и оси  $\pi$ -орбитали:

$$A = 43 \text{ Мгц} + 0,80 \times 76 \text{ Мгц} \simeq 100 \text{ Мгц}.$$

Согласие между вычисленным ( $\sim 100 \text{ Мгц}$ ) и наблюдаемым ( $\sim 87 \text{ Мгц}$ ) значениями  $A$  вполне удовлетворительно, если учесть, что слейтеровская орбиталь представляет собой довольно грубое приближение к рассматриваемому частному случаю.

Аналогично, взяв  $-38 \text{ Мгц}$  в качестве величины анизотропного взаимодействия в направлениях  $x$  и  $y$ <sup>36</sup>, можно оценить расщепление в случае магнитного поля, направленного перпендикулярно оси  $\pi$ -орбитали:

$$B \simeq C = 43 \text{ Мгц} + 0,80(-38 \text{ Мгц}) = 13 \text{ Мгц},$$

что также хорошо согласуется со значением  $14-17 \text{ Мгц}$ , полученным для иминоксильных радикалов. Наконец, отношение  $a(^{14}\text{N})/A(^{14}\text{N})=0,5$ , наблюдаемое для иминоксильных радикалов, близко к отношению константы изотропного сверхтонкого взаимодействия на  $^{13}\text{C}$  в  $^{13}\text{CH}_3$  ( $115 \text{ Мгц}$ ) к значению  $A(^{13}\text{C})$  ( $210 \text{ Мгц}$ ) в тщательно изученном радикале малоновой кислоты:  $a(^{13}\text{C})/A(^{13}\text{C})=0,55$ <sup>37</sup>.

Такое большое число согласующихся между собой результатов позволяет с высокой степенью надежности заключить, что неспаренный электрон в иминоксильных радикалах в основном (на  $80-90\%$ ) локализован на  $2p\pi$ -орбитали атома азота в соответствии с полярной валентной структурой:

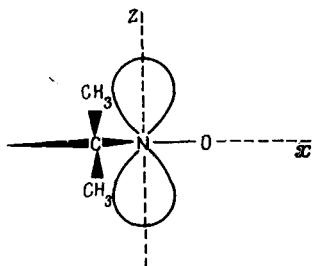


Рис. 3. Структура стерически экранированного иминоксильного радикала

Схематическое изображение  $2p\pi$ -орбитали в геометрии близлежащего фрагмента радикала дано на рис. 3.

Из приведенных рассуждений ясно, что ЭПР иминоксила зависит от ориентации радикала относительно внешнего поля. При хаотическом распределении ориентаций таких радикалов получается «порошков» спектр, показанный на рис. 4, *е*. Такие спектры получаются экспериментально, если измельчить кристаллы тетраметилциклобутандиона, содержащего иминоксильный радикал (I) в качестве примеси, или при наблюдении резонанса радикалов в стеклах. Спектры вида рис. 4, *д* получаются, если движение радикалов замедленно. При этом время корреляции переориентации радикалов ограничено условием

$$\tau^{-1} \ll |A - B|, \quad (3)$$

зависящим от анизотропии сверхтонкого взаимодействия. (Строго говоря, как будет ясно из дальнейшего обсуждения, следует учесть и некоторые члены, включающие анизотропию  $g$ -фактора.)

Резонансный спектр рис. 4, *е* можно почти точно воспроизвести с помощью машинных расчетов\*, включающих суммирование спектров при изотропном статистическом распределении ориентаций<sup>38</sup>. Дать простую интерпретацию всех деталей формы спектра невозможно, однако неко-

\* Теоретические расчеты были выполнены также в работе<sup>90</sup>. (Прим. перев.)

торые особенности этого «порошкового» спектра легко понять. Два крайних максимума (разделенных на  $\sim 64$  гс), а также часть центрального максимума получаются от радикалов,  $\pi$ -орбитали (оси  $z$ ) которых параллельны магнитному полю (вернее, отклоняются не более чем на  $15^\circ$ ). Центральный максимум спектра рис. 4, *e* содержит также значительный вклад от радикалов,  $\pi$ -орбитали которых примерно перпендикулярны приложенному магнитному полю. В этом случае расщепление на  $^{14}\text{N}$ , равное  $B \simeq C$  не разрешается из-за большой эффективной ширины линии в этой части спектра. Другие качественные особенности спектра, такие, как неодинаковое отклонение крайних линий от осевой линии спектра, характеризуют анизотропные члены спин-гамилтониана.

Рис. 4 показывает также, как изменяется спектр ЭПР иминоксильных радикалов в растворах в зависимости от вязкости. В промежуточной области между высокой (рис. 4, *e*) и низкой (рис. 4, *a*, *б*) вязкостью очень трудно выполнить *a priori* теоретический расчет формы линии. Приближенный полуэмпирический метод был развит Ицковичем<sup>38</sup>. На рис. 4, *в*—*д* и 5 даны для сравнения рассчитанные и наблюдаемые спектры. Следует особо отметить, что в этой области значений  $\tau$  спектры исключительно чувствительны к изменению характера движения радикала.

В области очень быстрого вращения (рис. 4, *a*, *б*) можно использовать теорию ширины линий ЭПР, развитую Макконнеллом<sup>40</sup>, Фридом и Френкелем<sup>41</sup> и Кивелсоном<sup>42</sup>. В этом случае каждая линия триплета характеризуется параметром ширины  $T_2(M)$ , где  $M=1; 0; -1$  соответствует трем возможным ориентациям ядерного спина  $^{14}\text{N}$ . Для иминоксильных радикалов  $T_2(M)$  дается выражением:

$$[T_2(M)]^{-1} = \tau \left\{ [3I(I+1) + 5M^2] \frac{b^2}{40} + \frac{4}{5} (\Delta\gamma H_0)^2 - \frac{4}{15} b \Delta\gamma H_0 M \right\} + X. \quad (4)$$

Здесь  $\tau$  — время корреляции изотропного молекулярного вращения,  $H_0$  — внешнее магнитное поле (в гауссах)  $I=1$  (спиновое квантовое число ядра  $^{14}\text{N}$ ),  $b=4\pi/3(A-B)$  и

$$\Delta\gamma = \frac{-|\beta|}{\hbar} [g_{zz} - 1/2(g_{xx} + g_{yy})]. \quad (5)$$

Член  $X$  учитывает вклад в уширение линии, не зависящий от  $M$ . Уравнение (4) удовлетворительно описывает форму линии, если анизотропное сверхтонкое взаимодействие имеет аксиальную симметрию ( $B=C$ ), вращение радикала изотропно и не слишком быстро, так что

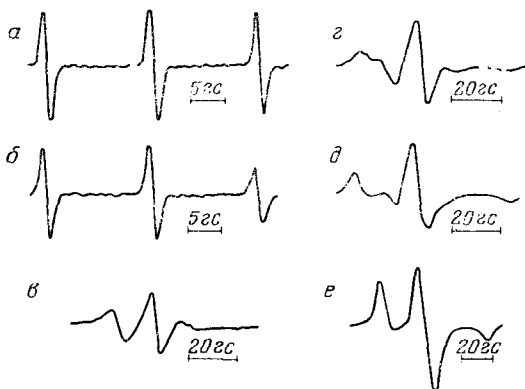


Рис. 4. Влияние вязкости на спектры ЭПР иминоксильных радикалов: *a*—2,2,5,5-тетрагидро-3-карбоксил-амидопирролидин-1-оксид (XXII) в воде при комнатной температуре<sup>21</sup>; *б*—XXII в 60%ном растворе сахарозы при комнатной температуре<sup>21</sup>; *в*—данзил-иминоксил (XXIII) в растворе: 76% глицерина, 19% воды, 5% этанола при 23°<sup>39</sup>; *г*—XXII в растворе: 90% глицерина, 5% воды, 5% этанола при 35°<sup>39</sup>; *д*—XXIII в растворе: 90% глицерина, 5% воды, 5% этанола при 15°<sup>39</sup>; *е*— в глицерине при 77° K<sup>21</sup>

$\omega^2\tau^2 \gg 1$  ( $\omega = g|\beta|H_0\hbar^{-1}$ ) и при условии  $(\pi a)^2\tau^2 \ll 1$  и  $b^2\tau^2 \ll 1$ . Более удобна другая форма уравнения (4):

$$\frac{T_2(0)}{T_2(M)} = 1 - \frac{4\tau}{15} b \Delta\gamma H_0 T_2(0) M + \frac{\tau}{8} b^2 T_2(0) M^2, \quad (6)$$

так как отношение  $T_2(0)/T_2(\pm 1)$  легко получить экспериментально. Время корреляции  $\tau$ , вычисленное по этому соотношению на основании спектра рис. 4, б, равно  $3 \cdot 10^{-10}$  сек., а для спектра рис. 4, а  $2,5 \cdot 10^{-11}$  сек.<sup>21</sup> \*.

#### IV. ВЕЩЕСТВА, ПРИМЕНЯЕМЫЕ В КАЧЕСТВЕ СПИНОВЫХ МЕТОК

В качестве спиновых меток при исследовании макромолекул биологического происхождения используются два типа веществ. Первый и важнейший класс включает стабильные гетероциклические иминоксильные радикалы, с функциональными группами, способными образовать ковалентную связь с активными группами макромолекулы без затрагивания неспаренного электрона. Многие метки этой серии были сконструированы, исходя из аналогии с известными в белковой химии специфическими реагентами. Разумеется, нет никакой гарантии, что радикалы будут обладать той же специфичностью, что и исходные соединения, но поведение традиционных реагентов может дать отправную точку для рассмотрения свойств соединений, применяемых в качестве спиновых меток.

Первым в этом ряду соединений был 2,2,5,5-тетраметил-3-изоциано пирролидин-1-оксил (VIII)<sup>21</sup>. Изоцианатная метка представляет в основном исторический интерес, так как она мало специфична и быстро разлагается в водном растворе, в котором приходится проводить опыты:

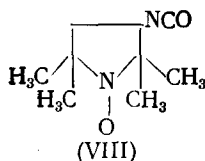
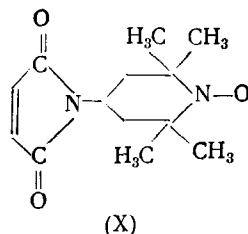
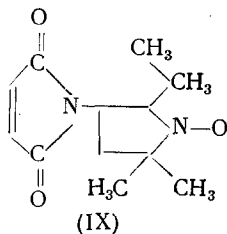


Рис. 5. Рассчитанные спектры ЭПР иминоксильных радикалов со средними значениями времен корреляции оцененными по методу Ицковича<sup>38</sup>: а —  $\tau = 4 \cdot 10^{-8}$  сек; б —  $\tau = 3,6 \cdot 10^{-8}$  сек; в —  $\tau = 7,2 \cdot 10^{-8}$  сек.

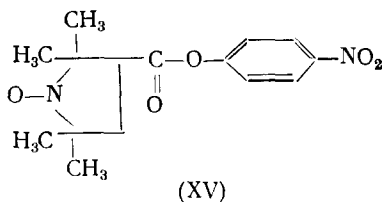
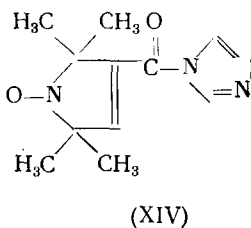
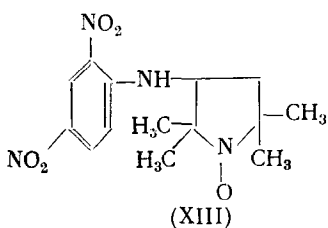
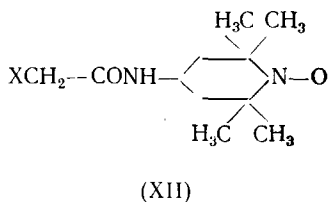
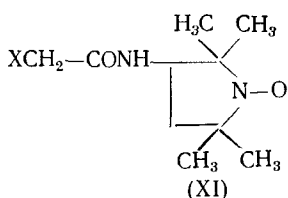
Более удачными оказались N-замещенные имиды малеиновой кислоты (IX) и (X)<sup>18, 43</sup>:



\* Зависимость формы спектров ЭПР иминоксильных радикалов от свойств среды подробно исследована Бучаченко и сотр.<sup>94</sup>.

Эти метки предназначались в качестве реагентов на сульфгидрильные группы. Они несколько отличаются по свойствам от модельного соединения N-этилимида малеиновой кислоты. Радикалы, полученные из этих соединений, по-видимому, взаимодействуют преимущественно с наиболее доступными сульфгидрильными группами, но склонны в большей степени, чем N-этилимиды малеиновой кислоты, к реакциям с раскрытием кольца<sup>18, 44, 45</sup>. Соединение (IX) через несколько минут превращается в воде в соответствующее производное малеиновой кислоты<sup>18</sup>; X гидролизуется в пределах часа<sup>16</sup>. Чувствительность к атаке по карбонилу проявляется и в том, что иминоксильные производные имида малеиновой кислоты легко реагируют с соединениями, содержащими аминокруппы<sup>18</sup>.

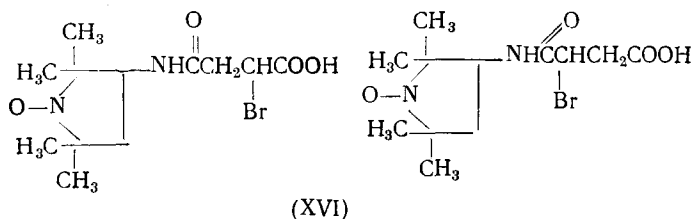
Пяти- и шестичленные галоацетамиды (XI), X=Br, I<sup>17</sup> и (XII), X=I<sup>16</sup>, еще не вполне химически охарактеризованы как спиновые метки. По-видимому, они работают как обычные алкилирующие агенты. Места, по которым они присоединяются, зависят от природы белка и условий проведения реакции<sup>17, 19</sup> в большей степени, чем для иодуксусной кислоты<sup>46</sup>. Производное динитрофторбензола (XIII), содержащее иминоксильный фрагмент, было получено для присоединения к концевым и ε-аминогруппам<sup>20</sup>. По аналогии с N-ацетилимидазолом<sup>47</sup> имидазолид 2,2,5,5-тетраметил-3-карбоксипирролин-1-оксила (XIV) предназначался для проведения реакции с тирозиновыми остатками<sup>16</sup>.



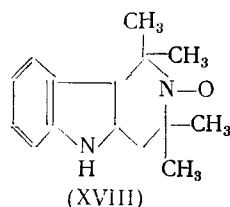
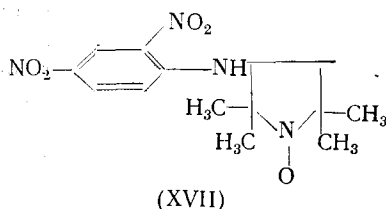
Два реагента были синтезированы для изучения некоторых специфических ферментов. По аналогии с *p*-нитрофенилацетатом<sup>48, 49</sup> сложный эфир *p*-нитрофенола и 2,2,5,5-тетраметил-3-карбоксипирролидин-1-оксила (XV) ацилирует остаток серина в активном центре α-химотрипсина<sup>15</sup>.

Аналогичная реакция наблюдается с активной SH-группой триозофосфата дегидрогеназы<sup>20</sup>. Смесь иминоксил-моноамидов α- и β-бромянтарной кислоты (XVI)<sup>19</sup> использовали по типу α-бромзамещенных кислот, реагирующих с известными аминокислотными остатками в актив-

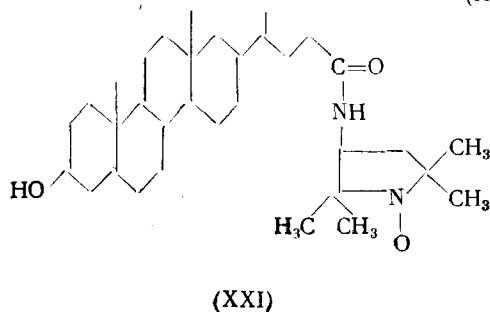
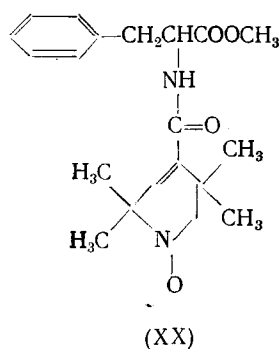
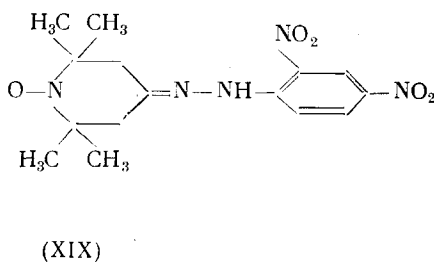
ном центре рибонуклеазы <sup>50</sup>:



Другой класс спиновых меток включает соединения, дающие комплексы с биологическими макромолекулами без образования химической связи. Два вещества, аналогичные красителям, N-(2,2,5,5-тетраметил-1-оксил-3-пирролидил)-2,4-динитроанилин (XVII) <sup>20</sup> и 2,2,4,4-тетраметил-1,2,3,4-тетрагидро-γ-карболин-3-оксил (XVIII) <sup>12, 23</sup> \*:



оказались пригодными для связывания с белками. Был синтезирован парамагнитный гаптен (XIX) <sup>39</sup>. Ведутся исследования специфического конкурентного ингибитора α-химотрипсина (XX) <sup>16</sup>. Для включения в липидные слои биологических мембран синтезировано производное холестерина (XXI) <sup>51</sup>:



\* См. также <sup>91</sup> (Прим. перев.).

## V. СПЕКТРЫ ЭПР СПИНОВЫХ МЕТОК, ПРИСОЕДИНЕННЫХ К МАКРОМОЛЕКУЛАМ

Парамагнитный гаптен (XIX) хорошо комплексуется с антителами, выработанными против динитрофенилбелка, с сохранением той же стехиометрии и примерно той же величины константы связывания, что и стандартный гаптен,  $\epsilon$ -N-динитрофенил-L-лизин<sup>39</sup>. В то время как свободный гаптен дает резонансный спектр свободно вращающейся частицы (рис. 4, а), радикал в комплексе с антителом дает спектр, весьма напоминающий рис. 4, г. Значительное увеличение времени корреляции (от  $\sim 10^{-11}$  до  $10^{-8}$  сек.) отражает уменьшение скорости вращения, которого следует ожидать, когда малая молекула присоединяется к большой, малоподвижной молекуле белка. Время релаксации вращения антител, согласно Краузе и О'Конски<sup>52</sup> порядка  $10^{-7}$  сек.

Того же типа эффекты наблюдаются, когда изоцианат-иминоксил (VIII) реагирует с поли-L-лизином<sup>21</sup>. Спектр ЭПР меченой полиаминокислоты в растворе при pH 8, приведенных на рис. 6, а, показывает, что движение радикала заторможено, но все же не столь медленно, как движение полимерной молекулы как целого.

Термин «слабо заторможенный» введен для описания спектров типа меченого поли-L-лизина, в котором линии лишь слегка уширены по сравнению со свободно вращающимся радикалом. Появление слабо заторможенного спектра означает в данном случае, что боковые цепи лизина, на которых, вероятно, сидит метка, обладают значительной гибкостью, подвижностью. Однако о состоянии макромолекулы можно судить даже при такой слабой зависимости движения метки от движения основной полимерной цепи. Например, при pH 11, когда поли-L-лизин имеет спиральную структуру<sup>53</sup>, спектр ЭПР более заторможен (см. рис. 6, б), чем при pH 8, когда полиаминокислоты пребывают в состоянии хаотического клубка. График зависимости времени корреляции  $\tau$  от pH для меченого поли-L-лизина<sup>21</sup> отчетливо напоминает кривую титрования того же полимера по удельному оптическому вращению.

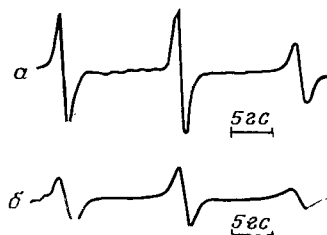


Рис. 6. Спектры ЭПР меченого поли-L-лизина: а — при pH 8; б — при pH 11<sup>21</sup>



Рис. 7. Спектр ЭПР бычьего сывороточного альбумина, меченого иминоксильным производным амида малеиновой кислоты (IX)<sup>18</sup>

Реакция бычьего сывороточного альбумина (БСА) со спин-метками приводит к более сложным спектрам ЭПР, чем в случае поли-L-лизина<sup>18, 21</sup>. Альбумин обрабатывали радикалом (IX) и неприсоединившийся радикал удаляли диализом.

Спектр меченого БСА, приведенный на рис. 7, явно представляет собой наложение двух спектров. Кроме «слабо заторможенных» компонент здесь появляются широкие линии, похожие на спектр иминоксильных в твердых стеклах (рис. 4, е). По нашей терминологии, этот спектр получается от «сильно заторможенной» метки.

Спектры ЭПР сильно заторможенного типа — вполне общее свойство спин-меченых белков. Их появление зависит от двух важных физических условий. Во-первых, молекула белка должна вращаться в растворе как целое достаточно медленно, чтобы выполнялось условие (3). (Т. е. время корреляции вращения жесткой молекулы белка должно пре-

вышать  $\sim 10^{-7}$  сек.) Во-вторых, спиновая метка не должна двигаться относительно молекулы белка, а должна быть с ней жестко связана. Таким образом, спиновая метка в течение по крайней мере  $10^{-7}$  сек. должна быть «жестко» связана с «жесткой» молекулой белка.

Время вращательной корреляции меченого БСА составляет примерно  $10^{-6}$  сек.<sup>54</sup>. Наличие сильно заторможенной составляющей в спектре ясно показывает, что часть парамагнитной метки строго ограничена в своем движении относительно белка. Предварительная обработка белка N-этилимидом малеиновой кислоты до реакции его с меткой предотвращает появление заторможенного сигнала, так что, по-видимому, заторможенная спиновая метка присоединена к сульфгидрильным группам<sup>18</sup>.

Как и в случае поли-L-лизина, структурные изменения БСА влекут за собой изменения в спектре ЭПР. При снижении pH среды от 4 до 2 молекула БСА сильно расширяется. Это проявляется в изменении ряда физических характеристик<sup>52, 55-57</sup>. При этом сильно заторможенная часть спектра постепенно переходит в спектр слабо заторможенной метки<sup>21, 56</sup> одновременно с изменением вязкости и оптической активности<sup>56</sup>.

При использовании ЭПР парамагнитного субстрата оказалось возможным наблюдать фермент в действии<sup>15</sup>. Гидролиз при участии  $\alpha$ -химотрипсина включает следующую последовательность реакций:

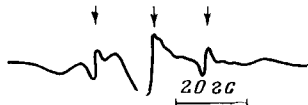
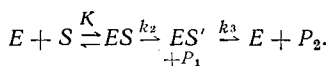


Рис. 8. Спектр ЭПР «нитро-ацилированного» ацил-химотрипсина в процессе отщепления ацильной группы. Стрелки указывают на появление узкого сигнала от освобожденных ионов ацилиминноксила



Для многих субстратов, в частности активных эфиров, таких, как эфиры *p*-нитрофенола, лимитирующей стадией является реакция  $k_3$  и время жизни промежуточного продукта  $ES'$  (фермент, ацилированный по сериновому остатку в активном центре) становится довольно большим<sup>57</sup>.

Если *p*-нитрофенольное производное (XV) действует на  $\alpha$ -химотрипсин при pH 4,5, когда  $k_3$  очень мала, то его спектр ЭПР становится «сильно заторможенным» соответственно образованию ацилированного фермента. При более высоких pH  $k_3$  можно измерить по скорости перехода широких компонент в «свободный» сигнал ЭПР (рис. 8). Полученные значения хорошо согласуются с результатами спектрофотометрических измерений скорости освобождения *p*-нитрофенолята в стационарных условиях.

Описанные выше опыты показали, что спектры ЭПР спиновой метки хорошо отражают известные ранее конформационные и биохимические изменения. В настоящее время проводятся обширные исследования других систем. В нашей лаборатории получены интересные предварительные результаты на некоторых белках. Алкогольдегидрогеназа из дрожжей, меченная иодацетамидиминоксидом (XI), дает сильно уширенный спектр ЭПР, который изменяется при добавлении кофермента НАД.

Кроме того, скорость реакции присоединения метки снижается в отсутствие НАД, подтверждая тем самым, что место связывания радикала совпадает с активным центром фермента<sup>17</sup>. Спектр ЭПР рибонуклеазы, меченной по активному центру производными  $\alpha$ -галоидкислот и амидов [соединения (XI), X-Br, и (XVI)], уширяется, когда в раствор вводится РНК. Было предпринято детальное исследование влияния условий опыта на этот эффект<sup>19</sup>.



Бычий сывороточный альбумин дает комплексы с некоторыми ароматическими производными иминоксильных радикалов, при этом спектр ЭПР спиновой метки становится «сильно заторможенным».

Связывание карболиниминоксила (XVIII)<sup>17</sup> и N-иминоксилдинитроанилина<sup>20</sup> происходит обратимо. Гидрофобный связывающий центр БСА содержит в себе какую-то активную группу, так как взаимодействие с производным динитрофторбензола (VIII) оказывается необратимым<sup>20</sup>. По предварительным данным, действуя алкилирующими иминоксильными производными, удастся пометить РНК<sup>58</sup>. По-видимому, метод спиновых меток окажется полезным также и для исследования нуклеиновых кислот.

Гемоглобин лошади реагирует с иминоксильным производным имида малеиновой кислоты (IX). Полученный парамагнитный продукт отличается весьма своеобразным поведением<sup>44</sup>. Присоединение метки идет в основном в положение  $\beta 93$  молекулы гемоглобина\*. Этот аминокислотный остаток был специфично связан ранее N-этилмалеимидом (NEM)<sup>59</sup>. Иминоксил (IX), так же как и NEM, реагирует быстрее с оксигемоглобином ( $\text{HbO}_2$ ), чем с дезоксигенированной формой гемоглобина ( $\text{Hb}$ )<sup>60</sup>, и в обоих случаях дает продукт со слабо заторможенным сигналом ЭПР.

Через небольшой промежуток времени после реакции с  $\text{HbO}_2$  вторичная реакция переводит метку, связанную с SH-группами, в другое состояние с сильно заторможенным движением спина. При дезоксигенации эта часть метки не освобождается. Метгемоглобин дает сходный спектр. Оксигенация гемоглобина немедленно после присоединения метки дает тот же эффект, но если отложить переход в  $\text{HbO}_2$  на 30 мин., то введение кислорода уже не приводит к затормаживанию метки.

Результаты, полученные при помощи спиновых меток, показывают, что конформации гемоглобина лошади вблизи  $\beta 93$  в состояниях  $\text{Hb}$  и  $\text{HbO}_2$  четко различаются. Это дополняет уже известный факт, что NEM вступает во вторичную реакцию после присоединения к  $\text{HbO}_2$  человека<sup>59</sup>. Этот процесс сопровождается эффектом Бора. Выдвигалось предположение; что в  $\text{HbO}_2$  при каталитическом действии гистидина имидное кольцо размыкается и метка затормаживается, с одной стороны, водородной связью образующейся карбоксильной группы, а с другой, — гидрофобными взаимодействиями между кольцом иминоксила и гидрофобными остатками белка<sup>44, 45</sup>. Вторичная реакция, в которой участвует меченный имидом малеиновой кислоты  $\text{Hb}$  лошади, состоит, вероятно, в некаталитическом гидролизе имидного кольца. Способность иминоксильного производного имида малеиновой кислоты к реакциям размыкания кольца известна (см. выше). Этот процесс в случае более стабильного NEM идет не столь быстро<sup>59</sup>.

Молекулярные модели на рис. 9, построенные по данным рентгеноструктурного анализа<sup>61</sup>, дают грубое представление о том, как спиновая метка располагается в положении  $\beta 93$  гемоглобина. Бумажная модель слева изображает целую  $\beta$ -цепь. Спиральные участки представлены цилиндрами, а гем-группы (из серого картона) видны позади спирали  $F$  и на концах  $G$  и  $H$ . Цистеин  $\beta 93$  находится в основании цепи  $F$ . Рейкой, выдвинутой немного вперед, показано положение атома ртути, используемой в качестве тяжелого атома в рентгеноструктурном анализе. Часть  $\beta$ -цепи, содержащая спирали  $F$ ,  $G$ ,  $H$ , вместе с присоединенной к ним иминоксильной меткой, была воспроизведена с помощью моделей

\* Обычно происходят и другие реакции, вероятно, присоединение по  $\varepsilon$ -аминогруппам, поэтому всегда наблюдается и спектр ЭПР сравнительно подвижных молекул спиновой метки. Эта часть спектра не меняется в ходе обсуждаемых экспериментов.

Кори—Полинга—Колтума. Обе модели выполнены в одном и том же масштабе и одинаково ориентированы на рис. 9, если не считать, что атомная модель справа расположена на несколько сантиметров ниже бумажной. Сера в остатке цистеина  $\beta 93$ , помеченная полоской, чтобы ее легче было заметить, видна слева внизу атомной модели; непосредственно справа от нее находится кислород иминоксила (помеченный X) и видны четыре метильные группы спиновой метки. Расположение метки согласуется со спектрами ЭПР меченых монокристаллов  $\text{HbO}_2$ <sup>45</sup>.

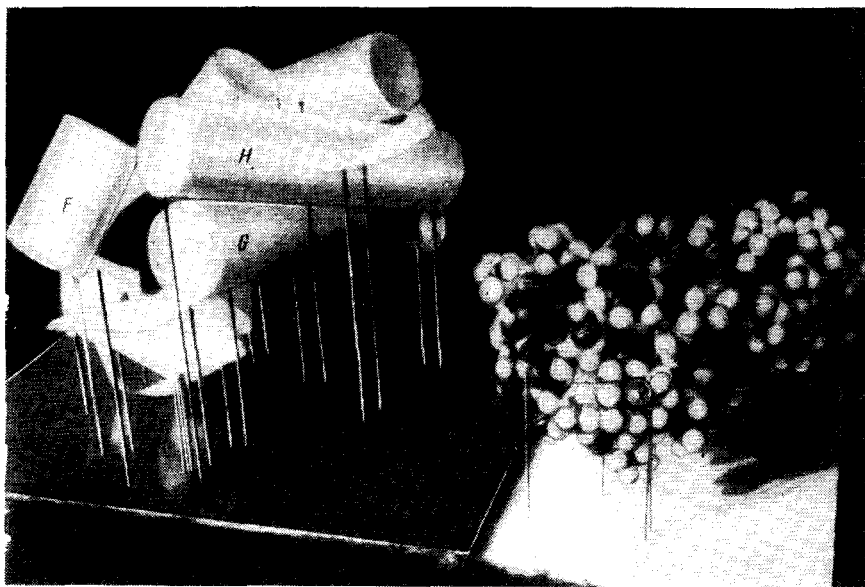


Рис. 9.  $\beta$ -цепь оксигемоглобина лошади

Вторая  $\beta$ -цепь получается из первой вращением вокруг вертикальной оси симметрии второго порядка, указанной в основании бумажной модели (рис. 9). Таким образом, получается, что спин-метка не только упрятана в складку своей собственной  $\beta$ -цепи, но и расположена между этой и другой  $\beta$ -цепью. Если принять все детали этой картины, то неспаренный электрон иминоксила окажется в непосредственной близости к гемовому железу и при подходящих условиях будет наблюдаться взаимодействие между этими парамагнитными центрами. Проводятся исследования, направленные к установлению такого взаимодействия<sup>62\*</sup>.

Гемоглобин был помечен также в  $\beta 93$  иодацетамидиминоксилами (XI) и (XII) ( $X=I$ ). Эти соединения дают те же результаты, что и метка — имид малеиновой кислоты<sup>17</sup>, но не происходит затормаживания карбоксильной группы. Спектры ЭПР заторможены частично в  $\text{Hb}$  и очень сильно в  $\text{HbO}_2$ . В переходной области (до насыщения кислородом) имеются обе компоненты. Спектр ЭПР содержит на одну изобестическую точку больше, чем оптический спектр поглощения. Наличие двух конформаций гемоглобина становится очевидным. Эти результаты показывают, что можно непосредственно исследовать связь между оксигенацией и конформационными изменениями и сделать выбор между двумя теориями аллостерических переходов<sup>63, 64</sup>.

\* Вне поля зрения автора остались советские работы в области исследования динамической структуры биополимеров, в частности, в связи с проблемой взаимодействия спин-меток с парамагнитными атомами в белках (см.<sup>92</sup>). (Прим. перев.).

## VI. СПИН-МЕЧЕННЫЕ АЛЛОСТЕРИЧЕСКИЕ БЕЛКИ

Концепция аллостерических белков предложена<sup>65</sup> для объяснения, почему на активность множества ферментов так сильно влияют малые молекулы (эффекторы), которые подчас совершенно не похожи на соответствующие субстраты, продукты или коферменты. В сущности, предполагается, что аллостерический фермент имеет различные стереоспецифические связывающие центры для субстрата и эффектора, пространственно удаленные друг от друга. Думают, что связывание эффектора приводит к специфическому конформационному переходу белка (аллостерический переход), который изменяет сродство активного центра к субстрату.

Такие аллостерические переходы не только могут быть ответственны за ингибирование по типу обратной связи в метаболических процессах, но и могут участвовать в генетическом контроле синтеза белка равно как и в более простых явлениях, например, кооперативном связывании кислорода гемоглобином (взаимодействие гем—гем)\*. Так как аллостерические конформационные переходы считаются широко распространенными и существенными в биологии, они, очевидно, представляют достаточно важный объект для исследования методом спиновых меток.

Качественно с физической точки зрения взаимодействия между центрами, удаленными друг от друга на расстояние, скажем, 10—100 Å, в компактной молекуле не столь уж удивительны, по крайней мере *post factum*. Действительно, если рассматривать молекулу белка как трехмерную совокупность шариков и пружинок, то вынужденное смещение одной какой-то группы шариков (вызванное молекулой эффектора) должно в общем случае привести к смещениям во всех других точках белка, включая активный центр, действующий на субстрат. Таким образом, мы предполагаем, что в аллостерическом белке (рис. 10) конформационный переход, произведенный комбинацией эффектора *E* со связывающим центром *e*, распространяется не только на активный центр субстрата *S*, но и на всякое положение *l* (рис. 10, б). Если спин-метка *L* присоединена к *l* (или, в частности, к *s*), то можно ожидать, что изменение конфигурации, индуцированное *E*, отразится в спектре ЭПР связанной метки. Будет наблюдаться и влияние связывания субстрата *S* (рис. 10, в).

Детальный механизм сопряжения удаленных точек на молекулярном уровне является предметом интенсивных исследований. Аллостерические эффекты распадаются на два класса; гетеротропные (взаимодействие между различными лигандами, схематически изображенное на рис. 10) и гомотропные (взаимодействие между одинаковыми лигандами). Для объяснения гомотропных аллостерических эффектов развиты две общие теории, одна принадлежит Мано, Виману и Шанже<sup>63</sup>, другая — Кошланду, Немети и Фильмеру<sup>64</sup>. Поскольку системы, где есть гетеротропные эффекты, почти всегда проявляют и гомотропный

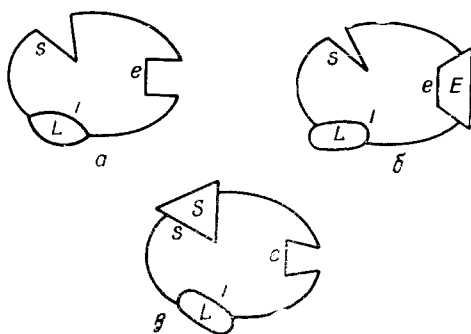


Рис. 10. Схематическое изображение аллостерического белка

\* Уместно отметить, что первую интерпретацию кооперативного связывания гемоглобином дал Полинг<sup>81, 82</sup>.

тип аллостеричности, можно допустить, что оба типа эффекта имеют сходный механизм<sup>63</sup> и модели одновременно приложимы к тем и другим. Обе теории гомотропных взаимодействий кратко обсуждаются ниже, причем особое внимание уделено возможности их проверки с помощью спин-меток.

Моно и сотр.<sup>63</sup> отмечают, что аллостерические белки, как правило, представляют собой олигомеры, состоящие из нескольких химически идентичных субъединиц, или протомеров. Они заключили, что протомеры в этих олигомерах организованы симметрично и постулировали, что каждый протомер имеет только один стереоспецифический связывающий центр для каждого данного лиганда. Эта модель допускает, что олигомеры могут существовать, по крайней мере, в двух состояниях, различающихся распределением и (или) энергией связей между протомерами. Кроме того, эти состояния различаются своим сродством к лигандам, а переходы между состояниями не меняют симметрию молекулы. Дальнейшее предположение состоит в том, что связывание лиганда с белком в любом состоянии не зависит от связывания любых других лигандов.

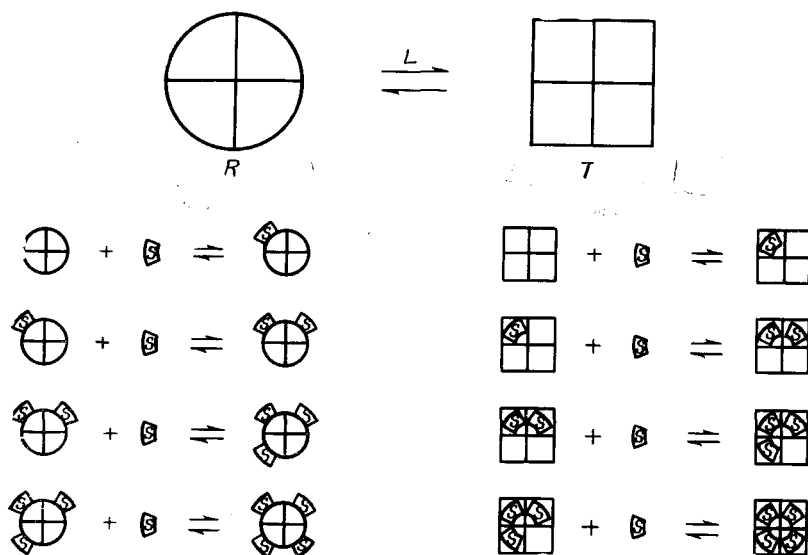
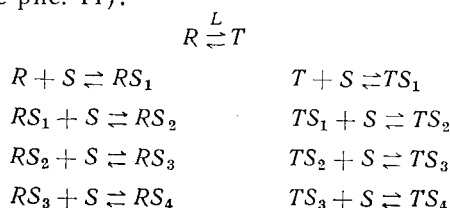


Рис. 11. Схема тетрамерного аллостерического белка по модели Моно, Ви-мана и Шанже<sup>63</sup>

Постулаты теории Моно можно проиллюстрировать следующим примером. Рассмотрим тетрамерный белок, находящийся в таутомерном равновесии между двумя состояниями, «круглым»  $R$  и «квадратным»  $T$  с константой равновесия  $L = [T]/[R]$ . Каждое из состояний имеет ось симметрии четвертого порядка (рис. 11). Сродство каждой субъединицы к лиганду  $S$  выражается через одну из микроскопических констант диссоциации  $K_R$  или  $K_T$  (соответствующих субъединицам в форме  $R$  или  $T$ ). Система, содержащая белок и лиганд, описывается следующим равновесием (см. также рис. 11).



Легко видеть, что микроскопические константы диссоциации выражаются так:

$$K_R = \frac{4 - (n - 1)}{n} \frac{[RS_{n-1}][S]}{[RS_n]}, \quad K_T = \frac{4 - (n - 1)}{n} \frac{[TS_{n-1}][S]}{[TS_n]}$$

Аллостерическое поведение системы характеризуется константой таутомерного равновесия и отношением  $c = K_R/K_T$  (отражающим относительное сродство таутомеров к лиганду  $S$ ). Если  $L$  велико, а  $c$  мало, то аллостерическое влияние лиганда велико; если  $\bar{Y}$ —долю центров, занятых лигандами (в обеих формах), отложить по оси ординат, а по оси абсцисс—меру концентрации лигандов  $\alpha = [S]/K_R$ , то получается S-образная кривая, характерная для кооперативного связывания субстрата (рис. 12).

Моно и сотрудники<sup>63</sup> показали, что их модель пригодна для обработки экспериментальных данных по поглощению кислорода гемоглобином, а также кинетики многих ферментативных реакций.

Другая теория аллостерических эффектов, предложенная Кошландом, Немети и Фильмером<sup>64</sup>, имеет более общий характер и включает

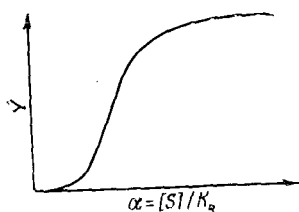


Рис. 12. Типичная кривая кооперативного насыщения субстрата,  $\alpha$  — эффективная концентрация субстрата,  $Y$  — доля занятых центров.

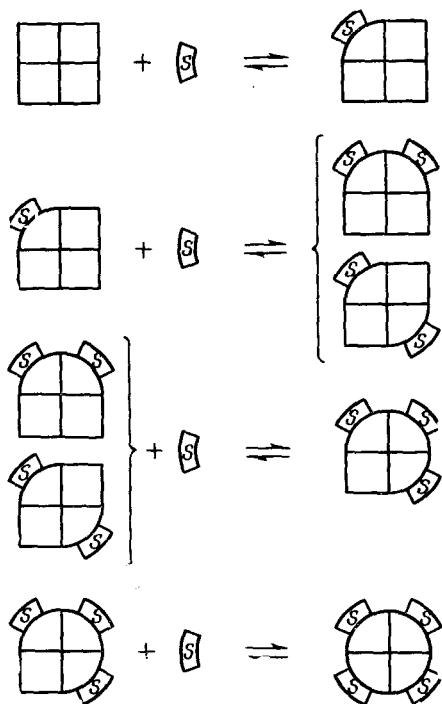
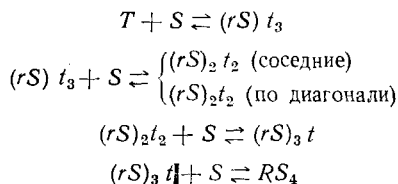


Рис. 13. Схема тетрамерного аллостерического белка по одной из предельных моделей Кошланда<sup>64</sup>

теорию Моно—Вильмана—Шанже как частный случай. Однако концепцию Кошланда можно применить к другим предельным случаям, причем экспериментальные данные также хорошо согласуются с теорией, хотя физическая картина аллостеричности совершенно другая.

Во всех предельных моделях Кошланда<sup>64</sup> предполагается, что индивидуальные протомеры могут быть в двух таутомерных конформациях, из которых заметно связывает лиганд лишь одна. Рассматриваются константы равновесия конформационных переходов каждой субъединицы и захвата лиганда связывающей таутомерной формой. В рассмотрение включаются также параметры, отражающие силу взаимодействия между субъединицами. Геометрические соотношения между субъединицами меняются от модели к модели. Геометрия определяет, какие пары субъединиц взаимодействуют между собой.

Предельная модель, дающая наилучшее совпадение с экспериментом по поглощению кислорода гемоглобином в трактовке Кошланда и сотр., представлена на рис. 13. В этом случае предполагается, что «круглая» форма, единственно способная связывать лиганд, имеется в заметных количествах только будучи связанной с  $S$ . Допускаются только взаимодействия между соседними субъединицами, но не по диагонали. Если «квадратную» субъединицу обозначить  $t$  (так что  $t_4$  эквивалентно  $T$  из предыдущей схемы), а «круглую» субъединицу, которая по определению комбинирует с  $S$ , обозначить  $r$ , то равновесие можно описать следующей схемой:



Анализ системы проводят исходя из констант микроскопического равновесия:

$$K_S = \frac{[rS]}{[r][S]},$$

$$K_t = \frac{[r]}{[t]}$$

и констант взаимодействия:

$$K_{rt} = \frac{[rt][r]}{[tt][r]},$$

$$K_{rr} = \frac{[rr][t][t]}{[tt][r][r]},$$

где индексом  $rt$  помечены взаимодействующие субъединицы, а  $r$  и  $t$  — не взаимодействующие.

Имеется одно коренное различие между двумя теориями аллостерического связывания субстрата белком. В схеме Кошланда — один конформационный переход на каждую связанную молекулу лиганда, тогда как в теории Моно число переходов субъединиц, вообще говоря, не равно числу захваченных молекул субстрата. Спиновые метки, по-видимому, дают идеальный метод, чтобы разрешить альтернативу такого типа, поскольку спектр ЭПР чувствителен к изменению локальной конформации.

Возьмем для примера гипотетический белок, использованный выше для иллюстрации обеих теорий. Но теперь мы присоединим к каждому протомеру спиновую метку. В растворе, содержащем лиганд, согласно схеме Моно, этот белок будет существовать в виде частиц различного типа, показанных на рис. 14, а. Здесь стрелкой указаны два типа резонансных спектров, которые можно получить от каждой из меток. При рассмотрении распределения всех возможных комплексов этого типа становится очевидным, что интенсивности двух различных спектров спин-меток не будут просто пропорциональны числу занятых и свободных центров. С другой стороны, согласно Кошланду, в растворе будут находиться комплексы вида, изображенного на рис. 14, б. Спектр каждой из спин-меток типа  $\rightarrow$  надо связать с субъединицей, не претерпевшей

конформационного изменения и не содержащей субстрата, а каждый спектр ЭПР метки типа  $\uparrow$  получается от субъединиц, которые образуют комплекс с молекулой субстрата. Таким образом, сравнивая влияние субстрата на спектр ЭПР спин-меток с количеством связанных молекул субстрата (оно определяется подходящим биохимическим или физико-химическим методом), можно сделать выбор между этими двумя простыми моделями аллостерических взаимодействий.

В приведенном выше анализе может возникнуть осложнение в случае систем, отвечающих схеме Кошланда, если спин-метка локализована вдоль границы между субъединицами так, что на нее действует более одного протомера. В этом случае можно принять, что получается по крайней мере три спектра ЭПР ( $\downarrow$ ,  $\nearrow$ ,  $\rightarrow$ ), как показано на рис. 14, в. Если такие осложнения имеют место, то для их обнаружения можно использовать отсутствие изобестических точек в спектре ЭПР, а также другие особенности спектров.

В ходе проводимых в настоящее время в нашей лаборатории исследований<sup>66</sup> выполнен ряд опытов такого рода, в которых  $\beta$ -цепи гемоглобина лошади были мечены по реакционноспособной SH-группе с помощью иодацетамидной метки (XI). В этих экспериментах серии спектров ЭПР, полученных при возрастании степени оксигенации, дают

хорошо выраженную изобестическую точку. Это само по себе согласуется как с теорией Моно, так и со схемой Кошланда. Однако наблюдается лишь одно изменение в спектре (например, от  $\rightarrow$  к  $\uparrow$ ) на каждую присоединенную молекулу кислорода, а это совместимо только с теорией Кошланда.

Можно было бы получить и более прямое доказательство концепции Кошланда, если бы оказалось возможным поместить метку в «щель» между субъединицами, так как тогда можно ожидать появления трех спектров ЭПР спиновых меток и отсутствия изобестических точек.

В опытах Огава и Макконнелла<sup>66</sup> обнаружено, что «кооперативность» захвата кислорода гемоглобином слабо зависит от присоединения спин-меток по активным SH-группам в положении  $\beta 93$ . Но сродство меченой молекулы к кислороду возрастает примерно в 10 раз. Особенно интересно, что за увеличение сродства к кислороду, по-видимому, одинаково ответственны все цепи, даже если только половина из них модифицирована меткой. Различаются ли коэффициенты связывания кислорода  $\alpha$ - и  $\beta$ -гемами неясно.

К вопросу об изменении структуры белка при связывании лигандов удобно подойти с помощью грубой, но не лишенной физического смысла аналогии — так называемого «эффекта масляной капли». Это, конечно, не предлагается всерьез как объяснение работы белков. Однако такое рассмотрение поясняет гомотропное и гетеротропное аллостерическое

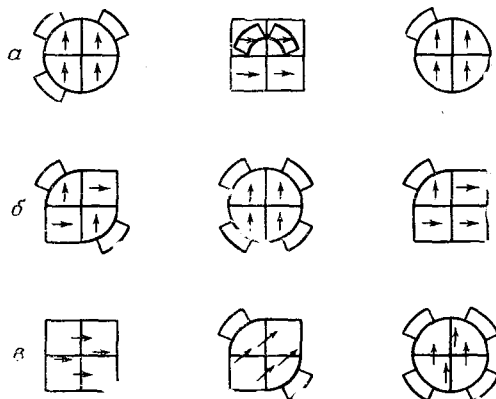


Рис. 14. Гипотетический спин-меченый аллостерический белок: а—некоторые разновидности частиц по модели Моно и др.<sup>63</sup>; б—примеры комплексов по теории Кошланда<sup>64</sup>; в—некоторые комплексы по Кошланду, когда спин-метка расположена между субъединицами

поведение и согласуется с наблюдениями над спин-меченым гемоглобином. Цель этой иллюстрации наметить направление поисков, которые могут привести к более реалистической, физически обоснованной теории аллостерических эффектов.

Рассмотрим каплю масла в воде, радиуса  $R_0$  того же порядка величины, что и средний радиус аллостерического белка. Пусть  $\gamma$  — поверхностное натяжение границы масло — вода. Тогда поверхностная свободная энергия системы капля масла — вода

$$F = \gamma A_0 = 4 \pi R_0^2 \gamma = 4 \pi \left( \frac{3}{4\pi} \right)^{2/3} V_0^{2/3} \gamma, \quad (7)$$

где  $A_0$  — площадь поверхности, а  $V_0$  — объем капли. Далее рассмотрим изменение поверхностной энергии при захвате каплей масла молекулы («субстрата»). При этом объем изменится от  $V_0$  до  $V_0(1+\delta)$ , где  $\delta$  мало (например 0,1). Соответствующее изменение свободной энергии

$$\Delta F = \gamma 4 \pi \left( \frac{3}{4\pi} \right)^{2/3} V_0^{2/3} (1 + \frac{2}{3} \delta - \frac{1}{9} \delta^2 + \dots) = \gamma A_0 (1 + \frac{2}{3} \delta - \frac{1}{9} \delta^2 + \dots). \quad (8)$$

Для рассмотрения «аллостерических» взаимодействий в этой системе мы введем две молекулы объемом  $\delta V_0$  и  $\delta V_0$  в каплю масла и оценим вклад в изменение свободной энергии  $\Delta F^{(2)}$ , он оказывается квадратичной функцией  $\delta$  (9):

$$\Delta F^{(2)} = -\frac{1}{9} \gamma A_0 (\delta_I^2 + \delta_{II}^2 + 2 \delta_I \delta_{II}). \quad (9)$$

Взаимодействие между молекулами «субстрата» в капле масла учитывается членом  $\delta_I \delta_{II}$ . Отметим, что для одинаковых молекул этот член всегда соответствует притяжению, независимо от знака  $\delta_I$  (отрицательный знак у  $\delta_I$  не имеет физического смысла для молекулы, введенной в каплю, но реальный субстрат, присоединенный к белку, вполне может вызвать сокращение объема системы). Таким образом, в этой модели «масляной капли» «гомотропные» взаимодействия всегда означают притяжение, тогда как «гетеротропные» могут приводить и к притяжению, и к отталкиванию, в зависимости от знаков  $\delta_I$  и  $\delta_{II}$ . В белках наблюдались только такие кооперативные гемотропные эффекты, которые отвечают притяжению, хотя удавалось наблюдать и антагонистические гетеротропные взаимодействия<sup>63</sup> кооперативного типа.

Интересно также рассмотреть включение трех молекул в каплю масла. В этом случае квадратичный член имеет вид

$$\Delta F^{(2)} = -\frac{1}{9} \gamma A_0 (\delta_I^2 + \delta_{II}^2 + \delta_{III}^2 + 2\delta_I \delta_{II} + 2\delta_{II} \delta_{III} + 2\delta_I \delta_{III}). \quad (10)$$

Если в уравнении (10)  $\delta_I = \delta_{II}$  соответствуют реальному субстрату, а  $\delta_{III}$  связано с химическим нарушением, то легко видеть, что в члене второго порядка химическое нарушение влияет на сродство масляной капли к субстрату (через  $\delta_I \delta_{III}$  и  $\delta_{II} \delta_{III}$ ), но не влияет на субстрат-субстратное взаимодействие ( $\delta_I \delta_{II}$ ). Читатель может припомнить, что именно этот тип эффекта имеет место в случае меченого гемоглобина (где  $\delta_I = \delta_{II}$  соответствуют  $O_2$ , а  $\delta_{III}$  — присоединенной метке).

Аналогию масляной капли можно продолжить, чтобы получить полуколичественную информацию об аллостерических взаимодействиях. Поверхностное натяжение можно оценить по порядку величины, приняв его равным  $\gamma \simeq 35 \text{ дин/см}$  ( $8,4 \cdot 10^{-7} \text{ кал/см}^2$ ). (Это значение поверхностного



натяжения на границе бензол—вода.) Глобула дезоксигемоглобина представляет собой сфероид с размерами ( $50 \text{ \AA} \times 55 \text{ \AA} \times 69 \text{ \AA}$ )<sup>67</sup>, что дает средний радиус  $29 \text{ \AA}$ . Она содержит четыре гемовые группы. Средний радиус оксигемоглобина, по оценке, сделанной по данным Мюрхеда и Перутца<sup>67</sup>, составляет  $\sim 26 \text{ \AA}$ , откуда можно заключить, что значение  $\delta_I = \delta_{II} = \dots$  должно укладываться в интервал от  $-0,0075$  до  $-0,15$ . Это соответствует энергии гем-гемового взаимодействия от  $1100$  до  $4000 \text{ кал/моль}$ . Наблюдаемая энергия гем-гемового взаимодействия  $\sim 3000 \text{ кал/моль}$  на каждую гем-группу<sup>68</sup>.

Если исключить из рассмотрения структуру активных центров, то вывод, который можно извлечь из этих расчетов, состоит в том, что аллостерические взаимодействия вполне могут быть весьма общим свойством всех белков. Таким образом, они не являются свойством умозрительно «хорошо спроектированного», детального взаимодействия между белковыми субединицами. Это во всяком случае верно для химических взаимодействий и действия субстратов, которые можно рассматривать как сравнительно слабые возмущения молекулы белка в целом.

Гомотропные и гетеротропные взаимодействия между субстратами и химическими возмущениями другого типа можно рассмотреть, если не количественно, то хотя бы качественно, представив в самом общем виде свободную энергию белка, в растворе в виде разложения в ряд по одной переменной  $\delta$ :

$$F = F_0 + \frac{\partial F}{\partial \delta} (\sum_i \delta_i) + \frac{1}{2} \frac{\partial^2 F}{\partial \delta^2} (\sum_i \delta_i)^2 + \dots, \quad (11)$$

где  $\delta_i$  — параметр напряжения, связанный с введением  $i$ -й молекулы (субстрата или другого типа) в белок. Хотя было бы недобросовестно заводить слишком далеко аналогию между аллостерическим белком и масляной каплей, следует отметить два сходных аспекта. По крайней мере некоторые (в особенности так называемые глобулярные) белки могут быть очень плотно упакованными структурами. В силу этого обстоятельства можно ожидать, что белок, как и масляная капля, будет изменять объем, когда в его структуру вводится посторонняя молекула. Изменение объема белка, как и в случае масляной капли, может вызвать увеличение или уменьшение гидрофобной поверхности, обращенной к воде. Такие эффекты можно обнаружить с помощью специально подобранных меток, спектр которых зависит от полярности среды.

## VII. СПИН-МЕЧЕННЫЕ КРИСТАЛЛЫ БЕЛКОВ

Если спин-метка присоединяется к белку и дает при этом спектр ЭПР, характерный для сильно иммобилизованного радикала, то естественно ожидать, что этот радикал в кристаллическом белке будет строго ориентирован<sup>40, 70</sup>. Это и было обнаружено в случае гемоглобина лошади, меченного малеимидными производными (IX) и (X)<sup>45</sup>, и  $\alpha$ -химотрипсина, ацилированного в активном центре спин-меченым субстратом (XV)<sup>71</sup>. В случае гемоглобина лошади анализ спектра ЭПР монокристалла приводит к следующим значениям параметров спин-гамильтониана:  $A=91$ ,  $B=22$ ,  $C=28 \text{ Мгц}$ ,  $g_{xx}=2,0078$ ;  $g_{yy}=2,0060$ ;  $g_{zz}=2,0027$ . Радикал ориентируется таким образом, что ось  $z$  сверхтонкого взаимодействия параллельна кристаллографической оси  $b$ , которая в то же время является осью симметрии второго порядка молекулы<sup>72</sup>, а  $x$  — компонента тензора СТС параллельна кристаллографической оси  $a$ . Удалось обнаружить и другую систему ориентированных молекул метки, связанных молекулярной осью симметрии второго порядка  $b$  с осями

тензора сверхтонкого взаимодействия  $x'$  и  $x''$ , которые отклоняются от оси  $x=a$  примерно на  $+15^\circ$  и  $-15^\circ$ . Две различаемые ориентации радикала могут быть обусловлены некоторой неэквивалентностью меченых  $\beta$ -субъединиц. Эта неэквивалентность, возможно, объясняется внутренней гетерогенностью белка <sup>73</sup> или соответствующими изомерными формами метки, а также влиянием, оказываемым на  $\beta$ -цепи меткой или, наконец (что более вероятно), дефектами кристалла <sup>74</sup>.

Спектры ЭПР спин-меток, присоединенных к молекулам белка в монокристаллах, должны указывать на свойства кристаллографической и молекулярной симметрии. Дифракция рентгеновских лучей позволяет сравнительно легко определить кристаллографическую симметрию белка. Если оси симметрии молекулы совпадают с кристаллографическими осями, то наличие таких молекулярных осей в белке тоже можно обнаружить без особых затруднений с помощью дифракции рентгеновских лучей <sup>75-78</sup>. Если некоторые или все оси симметрии молекулы не совпадают с кристаллографическими осями, то их обнаружение дифракционным методом представляет собой серьезную проблему. Так как спектры ЭПР меченых кристаллов должны зависеть как от симметрии кристалла, так и от симметрии молекулы, их можно использовать для получения информации о молекулярной симметрии белка. В нашей лаборатории ведутся эксперименты с кристаллами  $\alpha$ -химотрипсина, меченного в активном центре парамагнитным ацил-производным. Метка вводилась пропиткой кристаллов раствором XV <sup>71</sup> по методу, предложенному Сиглером, Джеффери, Мэтьюсом и Блоу <sup>79</sup>.

Параллельно проводилось рентгеновское исследование производных этого фермента. Эти опыты направлены на установление с помощью спин-меток наличия оси симметрии второго порядка. Известно, что система из двух половин димера  $\alpha$ -химотрипсина в кристаллах имеет ось симметрии второго порядка <sup>79</sup>.

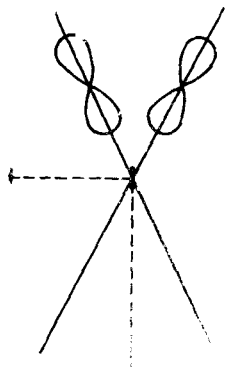


Рис. 15. Возможные расположения  $2p$ -орбит и три связанные с ними оси симметрии второго порядка. Сплошные линии — собственные оси симметрии каждой орбиты. Пунктирные линии показывают оси симметрии второго порядка в плоскости рисунка, третья ось к ним перпендикулярна

При использовании иминоксидов для определения молекулярной симметрии в кристаллах имеется одна тонкость. Поскольку неспаренный электрон находится главным образом на  $2p$ -орбите, имеющей цилиндрическую симметрию, спин-гамильтониан сверхтонкого взаимодействия [см. уравнение (1)] тоже имеет почти аксиальную симметрию. Так как, кроме того, спин-гамильтониан инвариантен относительно операции инверсии, два любых электрона на  $2p$ -орбитах можно перевести один в другой вращением вокруг трех осей второго порядка (см. рис. 15). Если действительно существует ось симметрии, вращением вокруг которой можно перевести орбиты друг в друга, эта ось должна совпадать с одной из трех осей вращения второго порядка. Для нахождения одной оси симметрии необходимы два топологически различных спин-меченых производных.

Такой повышенный интерес к симметрии молекул возникает в связи с важностью свойств симметрии в теоретической молекулярной биологии, в частности в теории аллостерических переходов <sup>63</sup> и теории комплементарности аллелей <sup>80</sup>. Меченые монокристаллы, несомненно, дают и много других возможностей для исследования молекулярной структуры. Особый интерес может представить определение расстояний между спин-метками, исходя из диполь-дипольного взаимодействия между ними.

\*       \*

\*

Мы рассмотрели здесь развитие метода спиновых меток. Было показано что ЭПР спин-меток отражает изменения конформации молекул и химические реакции, уже обнаруженные ранее другими методами молекулярной биологии и биохимии. Метод спиновых меток достаточно разработан и в настоящее время применяется для решения новых задач, в частности для исследования аллостерических конформационных переходов.

В заключение будет полезно резюмировать некоторые общие особенности спиновых меток как зонда для биологических систем. Высказывались критические замечания по поводу того, что во многих исследованиях фигурировали химически модифицированные, а потому нарушенные в той или иной мере макромолекулы. Однако такие нарушения часто не влияют на предположения, из которых исходят при проведении опытов. Например, симметрия фермента, по всей вероятности, не нарушается, когда метка присоединяется ко всем его субъединицам. Спин-меченые аллостерические белки сохраняли аллостерические свойства, и очень сомнительно, чтобы механизм взаимодействия качественно менялся. Синтетические спин-меченые субстраты проявляют изменения в спектрах ЭПР, которые должны быть тесно связаны с активностью фермента, действующего на субстрат. Спин-меченые монокристаллы, по крайней мере двух белков (гемоглобина и  $\alpha$ -химотрипсина), изоморфны немеченым кристаллам. Наконец, регистрация с помощью спиновых меток переходов спираль-клубок и других конформационных изменений дала результаты, вполне аналогичные данным, полученным по оптическому вращению и другими методами. Один из потенциально важных аспектов применений спектров ЭПР спиновых меток состоит в том, что их можно наблюдать при различных условиях: в монокристаллах белков, в растворах и более сложных системах, таких, как мембраны \*. Это означает, что информацию о молекулярной структуре, полученную методами дифракции рентгеновских лучей, в совокупности с данными по спектрам ЭПР кристаллических белков, по крайней мере, в некоторых случаях можно сопоставлять со спектрами ЭПР спин-меток в растворах (и, может быть, в биомембранах). Наши недавние работы по симметрии белков в кристаллах и растворах и по конформации гемоглобина в растворе дают примеры такого подхода.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. S. Ohnishi, H. M. McConnell, J. Am. Chem. Soc., **87**, 2293 (1965).
2. A. K. Hoffman, A. T. Henderson, Там же, **83**, 4671 (1961).
3. М. Б. Нейман, Э. Г. Розанцев, Ю. Г. Мамедова, Nature, **196**, 472 (1962).
4. A. K. Hoffman, A. M. Feldman, E. Gelblum, W. G. Hodgson, J. Am. Chem. Soc., **86**, 639 (1964).
5. A. K. Hoffman, A. I. Feldman, E. Gelblum, Там же, **86**, 646 (1964).
6. R. Briere, A. Rassat, Bull. soc. chim. France, **32**, 378 (1965).
7. A. K. Hoffman, C. A., **61**, 8191 (P) (1964).
8. E. G. Rozantzev, M. B. Neiman, Tetrahedron, **20**, 131 (1964).
9. П. А. Криницкая, Э. Г. Розанцев, М. Б. Нейман, Изв. АН СССР, сер. хим., **1965**, 115.
10. E. G. Rozantzev, L. A. Krinitskaya, Tetrahedron, **21**, 491 (1965).
11. R. Briere, H. Lemaire, A. Rassat, Bull. soc. chim. France, **32**, 3273 (1965).
12. R. M. Dupeyre, A. Rassat, P. Rey, Там же, **32**, 3643 (1965).
13. Э. Г. Розанцев, Изв. АН СССР, сер. хим., **1964**, 2187.
14. Э. Г. Розанцев, В. А. Голубев, М. Б. Нейман, Там же, **1965**, 379.

\* Метод парамагнитного зонда использован для исследования структуры биологических мембран в работе<sup>92</sup>. (Прим. перев.).

15. L. Berliner, H. M. McConnell, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **55**, 708 (1966).
16. C. L. Hamilton (неопубликованные данные).
17. S. Ogawa (неопубликованные данные).
18. O. H. Griffith, H. M. McConnell, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **55**, 8 (1966).
19. J. Smith, H. M. McConnell, (в печати).
20. W. Deal (неопубликованные данные).
21. T. Stone, T. Buckman, P. Nordio, H. M. McConnell, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **54**, 1010 (1965).
22. В. А. Голубев, Э. Г. Розанцев, *Изв. АН СССР, сер. хим.*, **1965**, 716.
23. Э. Г. Розанцев, А. В. Шапиро, Там же, **1964**, 1123.
24. W. Blackley, R. Reinhard, *J. Am. Chem. Soc.*, **87**, 802 (1965).
25. J. Chien (неопубликованные данные).
26. J. W. Linnet, *J. Am. Chem. Soc.*, **83**, 2643 (1961).
27. R. Dupeyre, A. Rassat, Там же, **38**, 3180 (1966).
28. R. Briere, H. Lemaire, A. Rassat, *Tetrahedron Letters*, **27**, 1775 (1964).
29. R. Dupeyre, H. Lemaire, A. Rassat, Там же, **27**, 1781 (1964).
30. E. H. Kosower, *J. Am. Chem. Soc.*, **80**, 3253 (1958).
31. O. H. Griffith, D. Cornell, H. M. McConnell, *J. Chem. Phys.*, **43**, 2909 (1965).
32. P. H. Friedlander, J. Robertson, *J. Chem. Soc.*, **1956**, 3083.
33. T. Cole, *J. Chem. Phys.*, **35**, 1169 (1961).
34. G. Giacometti, P. L. Nordio, *Mol. Phys.*, **6**, 301 (1963).
35. T. Cole, H. O. Pritchard, N. Davidson, H. M. McConnell, Там же, **1**, 406 (1958).
36. A. Carrington, H. C. Longuet-Higgins, Там же, **5**, 447 (1962).
37. H. M. McConnell, F. Ressenden, *J. Chem. Phys.*, **31**, 1688 (1959).
38. M. S. Itzkowitz, Ph. D. Thesis, Докт. диссерт., Calif. Inst. of Technology, 1966.
39. L. Stryer, O. H. Griffith, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **54**, 1985 (1965).
40. H. M. McConnell, *J. Chem. Phys.*, **27**, 709 (1966).
41. J. Freed, G. Fraenkel, Там же, **39**, 326 (1963).
42. D. Kivelson, Там же, **33**, 1094 (1960).
43. C. Hamilton, H. M. McConnell, (1967 в печати).
44. J. C. Boyens, H. M. McConnell, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **56**, 22 (1966).
45. S. Ohnishi, J. C. Boyens, H. M. McConnell, Там же, **56**, 809 (1966).
46. R. Cecil, В кн. H. Neirath ed. *The proteins*, v. 1, p. 380, N.-Y. Acad. Press, 1963; Г. Нейрат, Белкит, 1, ИЛ, М., 1956.
47. J. F. Riordan, W. E. Wacker, B. I. Vallee, *Biochemistry*, **4**, 1758 (1965).
48. B. S. Hartley, B. A. Kilby, *Biochem. J.*, **50**, 672 (1952).
49. F. J. Kézdy, M. L. Bender, *Biochemistry*, **1**, 1097 (1962).
50. R. L. Heinrickson, *J. Biol. Chem.*, **241**, 1393 (1966).
51. W. Hubbell (неопубликованные данные).
52. S. Krause, C. T. O. Kinsky, *Biopolymers*, **1**, 503 (1963).
53. J. Applequist, P. Doty, В кн.: M. A. Stahman, ed. *Intern. Symposium on Polyaminoacids, Polypeptides and Proteins*, Madison, Wisconsin, University of Wisconsin Press, 1962.
54. S. Krause, C. T. O'Konski, *J. Am. Chem. Soc.*, **81**, 33 (1953).
55. G. Weber, *Disc. Faraday Soc.*, **13**, 33 (1953).
56. J. T. Yang, J. F. Foster, *J. Am. Chem. Soc.*, **76**, 1588 (1954).
57. M. L. Bender, F. J. Kézdy, *Ann. Rev. Biochem.*, **34**, 49 (1959).
58. J. C. Smith (неопубликованные данные).
59. R. Benesch, R. E. Benesch, *J. Biol. Chem.*, **236**, 405 (1961).
60. A. Riggs, Там же, **236**, 1948 (1961).
61. M. F. Perutz, *J. Mol. Biol.*, **13**, 646 (1965).
62. J. Chien, H. M. McConnell (неопубликованные данные).
63. J. Menod, J. Wyman, J.—P. Changeux, *J. Mol. Biol.*, **12**, 88 (1965).
64. D. E. Koshland, J. Némethy, D. Filmer, *Biochemistry*, **5**, 365 (1966).
65. J. Monod, J. Wyman, J.—P. Changeux, *J. Mol. Biol.*, **6**, 306 (1963).
66. S. Ogawa, H. M. McConnell, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **58**, 19 (1967).
67. H. Muirhead, M. F. Perutz, *Nature*, **199**, 633 (1963).
68. J. Wyman, *Adv. in Protein Chemistry*, **19**, 268 (1964).
69. H. M. McConnell, *J. Chem. Phys.*, **20**, 701 (1952).
70. H. M. McConnell, J. C. Boyens, Там же, **71**, 12 (1967).
71. L. J. Berliner, H. M. McConnell (в печати).
72. A. F. Cullis, H. Muirhead, M. F. Perutz, M. G. Rossman, *Proc. Roy. Soc. (London)*, **A265**, 161 (1962).
73. M. F. Perutz, L. K. Steinrauf, A. Stockell, A. D. Bangham, *J. Mol. Biol.*, **1**, 402 (1959).
74. M. F. Perutz (частное сообщение, 1966).

75. D. W. Green, R. Aschaffenburg, J. Mol. Biol., **1**, 54 (1959).
76. M. F. Perutz, M. G. Rossman, A. F. Cullis, H. Muirhead, G. Will, A. C. North, Nature, **185**, 416 (1960).
77. B. B. Pickles, B. A. Jeffrey, M. G. Rossman, J. Mol. Biol., **9**, 598 (1964).
78. H. C. Watson, L. J. Banaszak, Nature, **204**, 918 (1964).
79. P. B. Sigler, B. A. Jeffrey, B. Matthews, D. M. Blow, J. Mol. Biol., **15**, 175 (1966).
80. F. H. Crick, L. E. Orgel, Там же, **8**, 161 (1964).
81. L. Pauling, Proc. Nat. Acad. Sci., USA, **21**, 186 (1935).
82. C. D. Corey, L. Pauling, R. W. Dodson, J. Phys. Chem., **43**, 825 (1939).

## Дополнительная литература\*

83. О. Л. Лебедев, С. Н. Казарновский, Труды по химии и химич. технологии, Горький, 1959, стр. 649.
84. Э. Г. Розанцев, Изв. АН СССР, ОХН, **1963**, 1669.
85. Э. Г. Розанцев, Там же, **1964**, 2187.
86. Э. Г. Розанцев, В. А. Голубев, Там же, **1966**, 891.
87. В. А. Голубев, Э. Г. Розанцев, М. Б. Нейман, Там же, **1965**, 1927.
88. М. Б. Нейман, Ю. Г. Мамедова, Э. Г. Розанцев, Азерб. хим. ж., **1962**, № 6, 37.
89. Ю. А. Лебедев, Э. Г. Розанцев, М. Б. Нейман, А. Я. Апин, ЖФХ, **1966**, 2340.
90. В. Б. Стрюков, Высокомолекуляр. соед., **A10**, 626 (1968).
91. Э. Г. Розанцев, А. Б. Шапиро, Н. Н. Камзолова, Изв. АН СССР, сер. хим., **1965**, 1100.
92. Г. И. Лихтенштейн, А. П. Пивоваров, П. Х. Бободжанов, Э. Г. Розанцев, Н. Б. Смолина, Биофизика, **13**, 396 (1968).
93. Л. Я. Гендель, М. Г. Гольдфельд, В. К. Кольтовер, Э. Г. Розанцев, В. И. Сускина, Биофизика, **13**, 1114 (1968).
94. А. Л. Бучаченко, Стабильные радикалы, Докт. диссерт., Ин-т хим. физики АН СССР, М., 1968.

Лаборатория физической химии Стенфордского  
университета, Стенфорд,  
Калифорния

---

\* Составлена переводчиком М. Г. Гольдфельдом.