

Ю. А. ЛАЗАРЕВ, Н. Г. ЕСИПОВА

СПЕКТРАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ СТРУКТУРНОЙ УПОРЯДОЧЕННОСТИ БЕЛКОВ КОЛЛАГЕНОВОГО ТИПА

(Представлено академиком Г. М. Франком 28 VIII 1972)

Формирование соединительной ткани в значительной мере определяется макромолекулярной структурой коллагена. Многие элементы молекулярной структуры пока еще мало изучены. Это относится, в частности, к пространственной упорядоченности тройной спирали нативного коллагена.

Настоящая работа посвящена изучению межпептидной сетки водородных связей, стабилизирующих трехспиральную коллагеновую структуру. Проведено сравнение параметров основных сеток Н-связей в молекулах, выделенных из разных организмов. Объектом исследования служили проколлагены кожи трески, щуки и крысы. Эти белки существенно отличны по аминокислотному составу и температуре денатурации (¹). Экспериментальная методика, выбранная нами, основана на использовании инфракрасной спектроскопии и дейтерозамещения пептидных водородов (², ³). При включении NH-групп в межпептидную сетку водородных связей, как было нами установлено на модельных соединениях, происходит резкое замедление скорости дейтерообмена. Тем самым во влажных пленках в насыщенной атмосфере тяжелой воды удается выделить полосы поглощения пептидных групп, образующих межцепочечные водородные связи. Во избежание денатурации белков пленки проколлагенов трески и щуки готовили при температуре 4–5°. Все измерения выполнены при температуре 20° в специально сконструированных герметических микрокуветах, позволяющих варьировать влажность и давление и работающих в комплекте с оптическими микроприставками к спектрофотометру UR-20 (Карл Цейс, Йена). Согласно полученным данным, во всех 3 проколлагенах проявляются полосы поглощения валентных и деформационных колебаний NH-групп, включенных в межпептидную сетку водородных связей. При определении частот валентных колебаний NH-групп были учтены поправки, связанные с влиянием ферми-резонанса (⁴), и найдены истинные значения невозмущенных частот (ν_a^0)

$$\nu_a^0 = \nu_A + \nu_B - 2\nu_{II},$$

где ν_A , ν_B и ν_{II} — наблюдаемые частоты полос амид А, амид В и амид II.

Как следует из анализа результатов (табл. 1), различия в частотах ν_a^0 незначительные и лежат в пределах возможных погрешностей эксперимента. Контуры полос валентных колебаний, а также их полуширины ($\Delta\nu = 75 \text{ см}^{-1}$) для исследованных проколлагенов совпадают. В табл. 1 приведены оценки средних значений длин водородных связей $R_{N-H\cdots O}$, полученных из корреляционных кривых в соответствии с величиной ν_a^0 (⁵, ⁶). Как можно видеть, расстояния $R_{N-H\cdots O}$ в проколлагенах столь различных организмов одинаковы. Все эти факты указывают на общность в характере водородного связывания. Основная межпептидная сетка водородных связей, стабилизирующих тройную спираль, выступает как

унифицированный элемент нативной коллагеновой структуры. Параметры основных сеток оказываются одинаковыми, несмотря на большую разницу в аминокислотном составе и термостабильности белков. Следует подчеркнуть, что унификация свойственна прежде всего нативной структуре, формирующейся в результате эволюционного процесса. В модельных соединениях, синтетических политрипептидах, изоморфных коллагену, параметры основной сетки водородных связей, по данным наших исследований, заметно различаются (в $(\text{gly} - \text{pro} - \text{pro})_n$ $\nu_a^0 = 3321 \text{ см}^{-1}$, в $(\text{gly} - \text{pro} - \text{opro})_n$ $\nu_a^0 = 3329 \text{ см}^{-1}$, в $(\text{gly} - \text{ala} - \text{pro})_n$ $\nu_a^0 = 3297 \text{ см}^{-1}$).

Чтобы получить сведения о числе NH-групп, участвующих в образовании межпептидной сетки водородных связей, мы обратились к исследова-

Таблица 1

Проколлагены	ν_A (см ⁻¹)		ν_B (см ⁻¹)		ν_{II} (см ⁻¹)		ν_a^0 (см ⁻¹)	$R_{\text{NH}\dots\text{O}}$ (Å)
	для всей цепи	межпеп- тидная сетка	для всей цепи	межпеп- тидная сетка	для всей цепи	межпеп- тидная сетка		
Кожа трески	3329	3330	3080	3100	1552	1572	3286	3,00 $\pm$ 0,06
Кожа щуки	3330	3332	3085	3095	1559	1571	3285	3,00 $\pm$ 0,06
Кожа крысы	3330	3331	3083	3094	1559	1571	3283	3,00 $\pm$ 0,06

Таблица 2

Проколлагены	NH _{необм} , %	NH _{необм} на 1000 остат.	pro + нур на 1000 остат.	gly на 1000 остат.	T _D , °C
Кожа трески	26	220	155	339	12
Кожа щуки	30	246	189	334	27
Кожа крысы	35	276	214	331	36
(gly — pro — pro) _n	100	333	666	333	92

дованию интенсивности инфракрасных полос поглощения. Для измерений использованы полосы валентных колебаний пептидных NH- и ND-групп, лежащих соответственно в области 3330 см⁻¹ и 2500 см⁻¹, и полосы деформационных колебаний пептидных NH-групп, лежащих в области 1550 см⁻¹. Мы проследили за изменением их интенсивности при дейтерировании в нативных и денатурированных образцах. Для перекрывающихся полос в области амид II (1550 см⁻¹) проведено графическое разделение спектра на отдельные компоненты. Для учета поглощения боковых аминокислотных остатков использованы данные, полученные из анализа спектров дейтерированных образцов, взятых на разных стадиях денатурации и ренатурации проколлагенов. Изменение интегральной интенсивности амидных полос при замещении водорода на дейтерий служило мерой числа обмениваемых пептидных групп. В качестве внутреннего стандарта, контроля толщины пленки выбраны полосы валентных колебаний CH₂- и CH₃-групп (в области 2800—3000 см⁻¹), интенсивность которых сохраняется в процессе дейтерозамещения и конформационных переходов коллагеновых белков. Найденное число межпептидных водородных связей, как видно из табл. 2, не одинаково и заметно уменьшается при переходе от коллагена кожи крысы к коллагенам кожи щуки и трески. В той же последовательности происходит падение термостабильности белков. Между этими параметрами, по-видимому, существует однозначное соответствие. Приведенные в

табл. 2 цифры служат дополнительным свидетельством в пользу модели коллагена, предложенной Ричем и Криком (⁷), с одной стабилизирующей водородной связью на триплет (или 333 Н-связями на 1000 остатков). Для коллагеновой модели Рамачандрана (⁷), включающей две системы межпептидных водородных связей, число их (550 Н-связей на 1000 остатков) существенно превышает полученные нами экспериментальные значения. Между содержанием пирролидиновых оснований в молекуле и долей медленно обмениваемых пептидных водородов ($NH_{необм}$), характеризующих степень «кристалличности» биополимера, обнаруживается

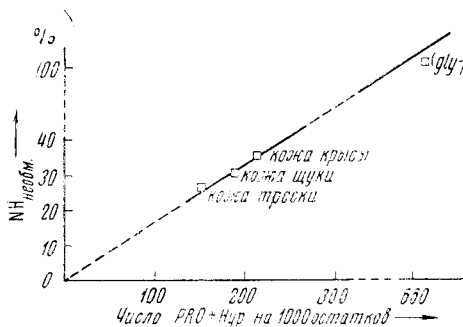


Рис. 1

линейная зависимость (табл. 2 и рис. 1). По-видимому, при участии остатков иминокислот наряду с глициновыми остатками, занимающими каждое первое положение в триплетах (^{7, 8}), в коллагеновой спирали реализуются условия, позволяющие образовать устойчивую межпептидную водородную связь. Легко гидратируемые водородные связи, очевидно, намного лабильнее и играют менее существенную роль в термостабильности коллагено-

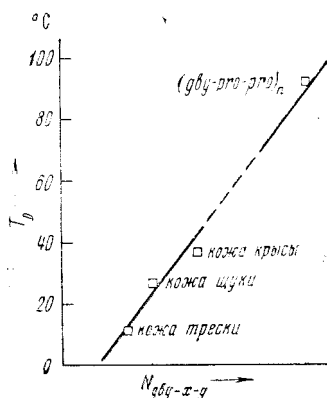


Рис. 2

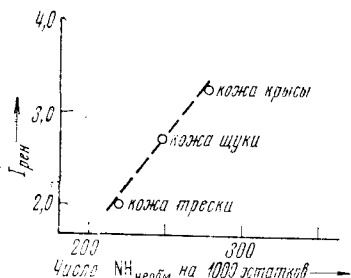


Рис. 3

вых белков. Мы провели сопоставление температуры денатурации (T_D) и относительной доли пролин- и оксипролинсодержащих триплетов (типа $(gly - \text{п} - \text{п})$, $(gly - \text{п} - \text{а})$, $(gly - \text{а} - \text{п})$, где а — аминокислота, п — иминокислота). Соответствующие значения получены из статистической обработки данных по последовательностям аминокислот в частичных гидролизатах коллагенов. Как явствует из рис. 2, между этими величинами имеет место отчетливая корреляция, близкая к линейной. В этой связи представляет несомненный интерес сопоставление спектральных и рентгеноструктурных данных. Для проколлагенов кожи трески, щуки и крысы были исследованы интегральные интенсивности и ширины основных рентгеновских рефлексов упорядоченной фазы — параметров, характеризующих относительное содержание и длину спиральных участков в образцах. Как видно из рис. 3, с уменьшением числа межпептидных водородных связей падает интенсивность специфичных для коллагена рефлексов ($I_{рентг}$), причем спектральный и рентгеноструктурный методы для исследованных белков дают результаты, линейно коррелирующие

друг с другом. Основываясь на анализе полученных данных, резонно предположить, что для коллагеновых белков существует предельное минимальное число межпептидных водородных связей, ниже которого образование устойчивой коллагеновой спирали в нативных условиях оказывается невозможным. В рамках линейных экстраполяций соотношений, приведенных на рис. 1, 2, 3, это число составляет 120 межпептидных водородных связей на 1000 остатков (при содержании иминокислот не менее 80 на 1000 остатков).

Результаты настоящей работы однозначно указывают на структурную гетерогенность коллагеновой молекулы. Наряду с участками спирали, где структура строго упорядочена аналогично кристаллической, присутствуют пептидные звенья, где межатомные расстояния и валентные углы фиксированы менее жестко, размеры водородных связей имеют больший разброс, структура более лабильна. Несомненно, все эти факторы имеют для коллагенов непосредственное биологическое значение, способствуя выполнению ими роли структурного белка в соединительной ткани организмов.

Институт биологической физики
Академии наук СССР
Пушкино-на-Оке

Поступило
16 VIII 1972

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Treatise on Collagen, Ed. G. N. Ramachandran, 1, London — N. Y., 1967, p. 48, 52, 278, 349. ² А. Хвидт, С. О. Нильсен, В сборн. Химия белка, М., 1969, стр. 242. ³ H. B. Bensusan, S. O. Nielsen, Biochemistry, 3, 1367 (1964). ⁴ T. Miyazawa, J. Mol. Spectr., 4, 155 (1960). ⁵ K. Nacomoto, M. Margoches, R. E. Rundle, J. Am. Chem. Soc., 77, 6480 (1955). ⁶ Л. Беллами, Новые данные по и.-к. спектроскопии сложных молекул, М., 1971, стр. 259. ⁷ A. Rich, F. H. C. Crick, J. Mol. Biol., 3, 483 (1961). ⁸ G. N. Ramachandran, Treatise on Collagen, 1, London — N. Y., 1967, p. 403.