

УДК 547.962+548.737

БИОХИМИЯ

Н. Г. ЕСИПОВА, В. Г. ТУМАНЯН

О ЛОКАЛИЗАЦИИ ВОДЫ В КОЛЛАГЕНЕ

(Представлено академиком В. А. Энгельгардтом 27 XII 1972)

Анализ картины дифракции от коллагена приводит к выводу о характерном вкладе гидратирующей воды в рефлексы на разных слоевых линиях. Путем расчетов дифракции при всевозможных положениях молекулы воды с учетом стереохимических критериев определены координаты трех молекул воды.

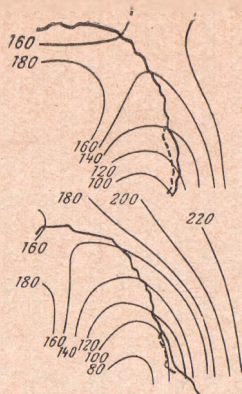
Как показано в ⁽¹⁾, вода — необходимый структурный фактор для формирования макромолекулы коллагена: высушивание приводит к утрате коллагеновой конфигурации, коллаген не ренатурирует в неводном растворителе. Со времени установления правильного типа структуры этого фибриллярного белка строились различные схемы гидратации с учетом дифракции для данного расположения молекул воды и возможности завязывания водородных связей. Между тем, поскольку точные координаты атомов коллагена неизвестны (из-за недостаточности рентгенографической информации), выполнение или невыполнение стереохимических критериев при гидратации не является доказательным, дифракционный же вклад оценивался лишь для ограниченного набора координат воды.

В настоящей работе мы провели исчерпывающее рассмотрение возможных координат воды в дифракционном и стереохимическом плане, с учетом экспериментальных рентгенографических данных по коллагену и моделирующим его полипептидам и известных из литературы вариантов модели коллагена (координаты атомов в которых несколько разнятся друг от друга).

При сравнении экспериментальных и расчетных значений интенсивностей для известных моделей коллагена выявляется расхождение на 7, 3 и 0 слоевых линиях (здесь и далее спираль коллагена аппроксимируется спиралью 3/10). Самым непротиворечивым и универсальным средством приведения расчетных интенсивностей в соответствие экспериментальным является надлежащая посадка молекул воды на макромолекулу. Другие способы оказываются либо неуниверсальными (так, введение статистики расположения молекул «вверх» и «вниз» позволяет согласовать интенсивности на 7 и 3, но не на 0 слоевых линиях и то только для синтетических полипептидов), либо встречаются с затруднениями (уширение модели меняет интенсивности в нужную сторону, но более широкая модель энергетически менее выгодна и менее удобна для гидратации).

Наконец, к тому же выводу о необходимости посадки молекул воды при условии специфического вклада в дифракционную картину приводят данные рентгенографического эксперимента на образцах с различным содержанием воды; в этом случае отсутствие точной модели тройной спирали не является ограничением.

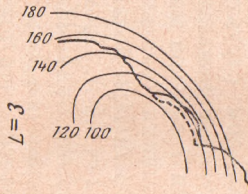
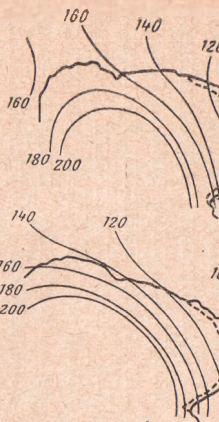
Анализ экспериментального материала на коллагене и моделирующих его полипептидах (как при расчете дифракции для данной модели и данного количества воды на трипептид, так и при интерпретации изменения картины дифракции при дегидратации) приводит к заключению: координаты молекул воды должны быть такими, чтобы усиливалась интенсивность рассеяния на 7 и 10 слоевых линиях, а 3 слоевая линия, напротив, ослабевала по сравнению с трансформом «сухой» молекулы. Влияние упя-



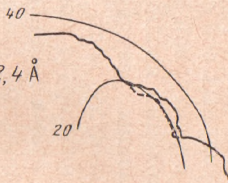
$Z = 4,0 \text{ Å}$



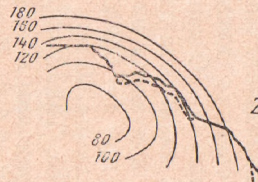
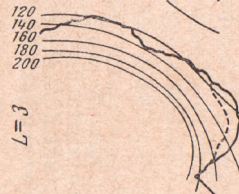
$Z = 3,2 \text{ Å}$



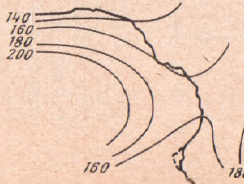
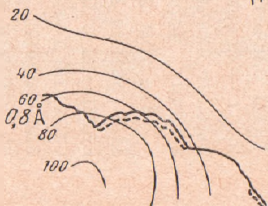
$Z = 2,4 \text{ Å}$



$Z = 1,6 \text{ Å}$



$Z = 0,8 \text{ Å}$



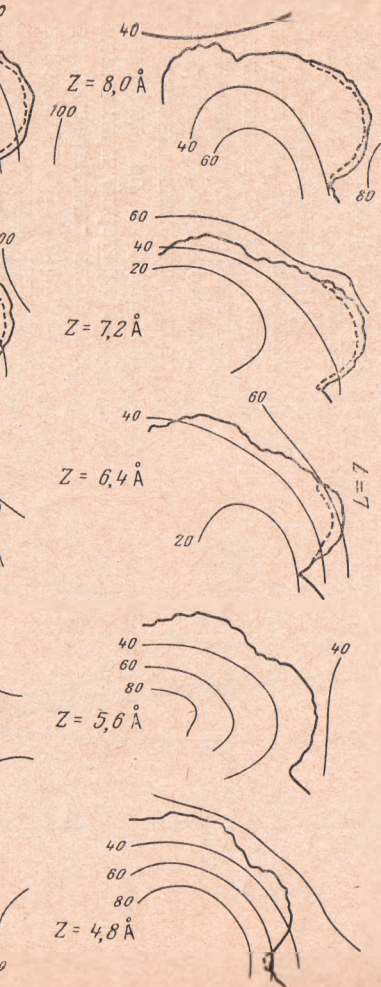


Рис. 1. Дифракционный вклад молекулы воды для 3 и 7 слоевых линий и контакты (утолщенный контур) и водородные связи (пунктир) молекулы воды с атомами макромолекулы

ковки, которое необходимо учитывать, делая этот вывод, не может сказаться на 3 слоевой линии (п, конечно, на 10), где профиль трансформации таков, что смещение лауэвского максимума вызвало бы изменение интенсивности при изменении влажности, обратное наблюдаемому. Труднее исключить влияние упаковки на 7 слоевой линии, однако количественные оценки дифракции от данной структуры при данной влажности требуют положительного вклада воды в интенсивность рассеяния на этой слоевой. Этот вывод тем более достоверен, что изменение параметра d на 7 слоевой мало, так что изменения интенсивности за счет изменения положения рефлекса не могут быть значительными.

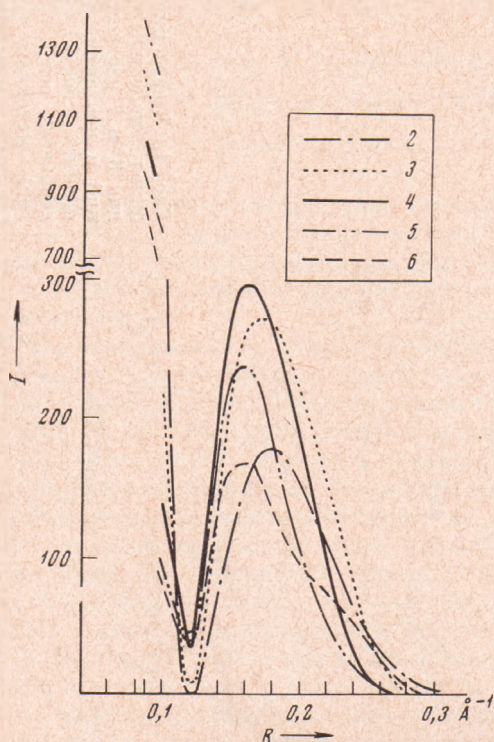


Рис. 2. Дифракционный вклад воды на экваторе. Показаны Фурье-трансформанты от системы коллаген + вода при разных расстояниях (2—6 Å) молекулы воды от оси спирали

кулой воды всей области асимметричной единицы с шагом 0,5 Å. Результаты расчетов для 3 и 7 слоевых линий представлены на рис. 1 в виде карт — сечений перпендикулярных оси спирали; цифра на изолинии показывает значение квадрата структурной амплитуды при помещении воды в точку, через которую проходит изолиния.

На том же рис. 1 показаны результаты стереохимических расчетов. Программа перемещает молекулу воды по всей области асимметричной единицы с шагом 0,2 Å и фиксирует координаты воды, при которых расстояние хотя бы до одного атома тройной спирали меньше суммы Ван-дер-ваальсовых радиусов. Утолщенные линии на рис. 1 показывают границу, до которой могут быть придвинуты молекулы воды без нарушения Ван-дер-ваальсовых контактов. Координаты, при которых вода может образовать водородные связи с кислородом структуры, полученные при расчетах с уменьшенным O—O-контактом, показаны пунктиром.

Из рис. 1 видно, что для 7 слоевой максимальная из числа пересекающих контур контактов изолиния (значение 80) дает только две области пересечения при $z = 0,8$ и 4 Å. При больших z имеется только одно пересечение для линии 60 при $z = 6,4$ Å. Промежуточные области не представляют интереса. Таким образом, принимая во внимание только данные по 7 слоевой, приходим к координатам воды r, ϕ, z : 4,6 Å, 70°, 0,8 Å; 5,2 Å, 0°, 4 Å; 6 Å, 30°, 6,4 Å. Интересно, что при этом как раз оказываются возможными водородные связи с O_1, O_2 и O_4 соответственно.

Итак, мы имеем дифракционный критерий для локализации молекул воды, подтверждаемый дополнительно данными по замене воды на другие растворители для синтетических полипептидов, а за стереохимический критерий принимаем возможность завязывания водородных связей между водой и кислородами амидных групп и, возможно, азотом иминных групп.

Для оценки дифракционного вклада воды при разных координатах мы написали программы для вычислительных машин БЭСМ-4 и БЭСМ-6, вычисляющие значение цилиндрически усредненной Фурье-трансформанты при прохождении моле-

Для 3 слоевой ослабление, соответствующее изолинии 80, имеет место при $z = 0,8 \text{ \AA}$, 100 — при $z = 3,6-4 \text{ \AA}$, 120 — при $z = 5,6 \text{ \AA}$ и 140 — при $z = 7,2 \text{ \AA}$. Пересечения со стерическим контуром дают единственные решения: $4,6 \text{ \AA}$, 70° , $0,8 \text{ \AA}$; $5,4 \text{ \AA}$, 6° , $3,6 \text{ \AA}$; $6,6 \text{ \AA}$, 80° , $5,6 \text{ \AA}$; $9,4 \text{ \AA}$, 30° , $7,2 \text{ \AA}$. Первые два и последнее решения находятся в согласии с данными для 7 слоевой; третье решение не представляет интереса: соответствующего решения мы не находим для 7 слоевой и в этой области невозможно завязывание водородных связей. Взяв области перекрывания решений для этих двух слоевых, уточняем координаты мест посадки воды: $4,6 \text{ \AA}$, 72° , $0,8 \text{ \AA}$; $5,2 \text{ \AA}$, 0° , $4 \text{ \AA}$; $9,2 \text{ \AA}$, 35° , $6,8 \text{ \AA}$.

Для 0 слоевой линии эксперимент дает большее, чем расчетное для «сухой» макромолекулы, отношение интенсивностей 2 порядка отражения к первому. Этот факт отмечается в (2), где для согласования интенсивностей предлагается более широкая модель макромолекулы. На рис. 2 показаны результаты расчета 0 слоевой линии при различной удаленности молекулы воды от оси спирали. Отношение интенсивностей максимально при $r = 4-5 \text{ \AA}$, что хорошо согласуется с приведенными выше координатами и оценкой, проведенной в (4).

Наконец из рис. 3, показывающего зависимость интенсивности меридионального отражения на 10 слоевой от сдвига воды по z , следует, что при определенных выше координатах эта слоевая должна усиливаться за счет гидратации, что и наблюдается в эксперименте.

Анализ полученных координат показывает, что первая молекула воды ($z = 0,8 \text{ \AA}$) может образовать через водородные связи мостик между O_1 и O_2 соседних цепочек. Этот мостик постулировался еще в (3), но только в настоящей работе получены рентгенографические доказательства его существования. Наличие мостика воды налагает ограничения на модель; так, удовлетворительное расстояние O_1O_2 имеют лишь модель Рамачандрана (4) и модели, полученные в (5). Вторая молекула воды ($z = 4 \text{ \AA}$), образующая водородную связь с O_2 , возможно, образует вторую водородную связь с азотом пирролидинового кольца или кислородом O_3 оксипролина в 3 положении.

Точное положение молекул воды естественно зависит от используемой модели. Приведенные выше иллюстрации получены для координат Рича (6); рассчитанные нами по другим моделям координаты воды незначительно отличаются от приведенных. Наконец, при оценке координат воды, предложенных в (2, 7), приходим к выводу, что в каждом случае положение одной из молекул не согласуется с дифракционным критерием.

Институт молекулярной биологии
Академии наук СССР
Москва

Поступило
22 XII 1972

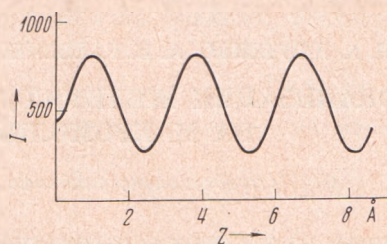


Рис. 3. Дифракционный вклад воды для меридионального рефлекса на 10 слоевой линии при различных положениях молекулы воды по оси z

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Н. Г. Есипова, Н. С. Андреева, Т. В. Гатовская, Биофизика, 3, 529 (1958). ² W. Traub, A. Yonath, J. Mol. Biol., 16, 404 (1966). ³ R. E. Burge, P. M. Cowan, S. McGavin, In: Recent Advances in Gelatin and Glue Research, London—N. Y., 1958, p. 58. ⁴ G. N. Ramachandran, In: Treatise on Collagen, 1, N. Y., 1967, p. 132. ⁵ V. G. Tumanyan, Biopolymers, 9, 955 (1970). ⁶ A. Rich, F. H. C. Crick, Nature, 176, 915 (1955). ⁷ G. N. Ramachandran, R. Chandrasekharan, Biopolymers, 6, 1649 (1968).