

Т. В. ЗАМАРАЕВА, В. И. МАЗУРОВ,
действительный член АМН СССР В. Н. ОРЕХОВИЧ

ДЕЙСТВИЕ БАКТЕРИАЛЬНОЙ КОЛЛАГЕНАЗЫ НА КОЛЛАГЕН, СИНТЕЗИРОВАННЫЙ В ПРИСУТСТВИИ АЗЕТИДИН-2-КАРБОНОВОЙ КИСЛОТЫ

При изучении действия аналогов пролина на синтез коллагена и других пролинсодержащих белков в хрящевой ткани куриных эмбрионов ранее было показано, что некоторые из них (азетидин-2-карбоновая кислота, цис-фторпролин и т. д.) могут включаться вместо пролина в полипептидные цепи коллагена (^{1, 2}).

Известно, что уникальная структура коллагена, его физико-химические свойства, способность к расщеплению коллагеназами в большой степени определяется наличием в коллагене остатков пролина и оксипролина и их специфическим расположением в полипептидных цепях этого белка (³). В связи с этим можно было ожидать, что замещение пролиновых остатков коллагена на аналог приведет к образованию белка с измененными свойствами. Полученные результаты, действительно, показали, что оставшиеся незамещенными на азетидин-2-карбоновую кислоту (А2КК) пролиновые остатки коллагена значительно хуже гидроксилируются коллагеновой пролин-гидроксилазой, чем пролиновые остатки белка, синтезированного в обычных условиях — без аналога. В дальнейшем было также установлено, что коллаген, содержащий А2КК, не выводится из клетки во внеклеточное пространство (⁴), хотя почти и не отличается от обычного коллагена по тепловой стабильности и по способности к образованию фибриллярных структур (⁵).

Как уже указывалось выше, пролиновые остатки коллагена играют важную роль для субстратной специфичности бактериальных коллагеназ — ферментов, расщепляющих только белки группы коллагена. Известно, что бактериальные коллагеназы гидролизуют в коллагене пептидную связь между Р и Х в последовательности: Р — R — X — P, где Р — остатки пролина и оксипролина, Х — остатки глицина или аланина, а R — остаток любой другой аминокислоты.

В связи с этим представляло интерес выяснить, каким образом замещение пролиновых остатков полипептидных цепей коллагена на аналоги может отразиться на его способности расщепляться бактериальными коллагеназами.

В опытах использовали высокоочищенные препараты коллагеназы *Cl. histolyticum* или *Cl. perfringens*, не содержащие примесей протеиназ*. Субстраты для коллагеназной реакции получали из хрящевой ткани 11-дневных куриных эмбрионов. Пробы, содержащие по 3 берцовых косточки куриных эмбрионов, инкубировали в солевой среде с 600 мкг А2КК в течение 1 часа, затем добавляли 4 мкг С¹⁴-пролина и инкубацию продолжали еще 2 часа. Контрольные пробы инкубировали в тех же условиях, но без добавления аналога. После окончания инкубации ткань гомогенизировали в дистиллированной воде и гомогенат центрифугировали в те-

* Мы выражаем благодарность Г. А. Левдиковой и Н. И. Соловьевой (Институт биологической и медицинской химии АМН СССР, Москва), предоставившим нам высокоочищенные препараты ферментов.

чение 1 часа при 100 000 г. Полученную надосадочную жидкость диализовали против дистиллированной воды и C^{14} -коллаген, содержащийся в надосадочной жидкости, использовали в качестве субстрата.

Для исследования гидроксирования пролиновых остатков коллагена, синтезированного в обычных условиях и в присутствии А2КК, часть C^{14} -коллагена после гидролиза в 6 N HCl использовали для определения общей радиоактивности и радиоактивности оксипролина (^{2, 6}), величины которых даны без учета эффективности счетчика и потерь в процессе выделения продуктов окисления оксипролина.

Расщепление препаратов коллагена бактериальной коллагеназой проводили в системе (общий объем 2 мл), содержащей 2000—5000 имп/мин C^{14} -коллагена, 10 мкг коллагеназы, 0,05 M трис-HCl-буфер, pH 7,5, 0,4 mM CaCl₂. Инкубацию проб проводили при 37° в течение 90 мин. После окончания инкубации к пробам на холоду добавляли 1 мг казеина в 0,1 M фосфатном буфере, pH 7,4, и 50% ТХУ до 5% концентрации; образующиеся осадки наносили на миллиметровые фильтры («RUFs», Чехословакия). Радиоактивность осадков просчитывали в газопотоочном счетчике. Степень расщепления C^{14} -коллагена, синтезированного в обычных условиях и в присутствии аналога, рассчитывали по величинам радиоактивности нерасщепленного белка, инкубируемого без коллагеназы или с ферментом, и выражали в процентах. За 100% принимали величину радиоактивности коллагена, инкубируемого без коллагеназы.

Как видно из табл. 1, при определении степени нарушения гидроксирования пролиновых остатков в коллагене, синтезированном в присутствии А2КК, нами были подтверждены полученные ранее данные о том, что после включения этого аналога в коллаген содержание C^{14} -оксипролина снижается на 30—53%. Было также установлено, что C^{14} -коллаген, содержащий А2КК, намного труднее (на 34—84%) расщепляется бактериальной коллагеназой, чем белок, синтезированный в обычных условиях.

По нашим данным, торможение включения C^{14} -пролина в белки хрящевой ткани куриных эмбрионов в присутствии А2КК не всегда сопровождается нарушением образования оксипролина в коллагене, несмотря на идентичность условий проведения опытов. По всей вероятности, это связано с тем, что количество молекул А2КК, включенных в коллаген, может при использовании различных препаратов ткани довольно резко

Таблица 1

Расщепление бактериальной коллагеназой C^{14} -коллагена, содержащего А2КК (гидроксирование нарушено)

Условия синтеза коллагена	Гидроксирование, %	Нарушение гидроксирования по сравнению с контролем, %	Радиоактивность нерасщепленного белка, имп/мин на пробу		Количество расщепленного C^{14} -коллагена, %	Расщепление субстратов, %
			без коллагеназы	с коллагеназой		
Контроль	10,3	53	616	363	41	100
А2КК	4,9		191	179	7	17
Контроль	9,5	34	2406	1578	34,5	100
А2КК	6,3		512	472	8	23
Контроль	6,7	30	2218	1373	38	100
А2КК	4,7		513	387	25	66
Контроль	7,8	49	1829	1138	38	100
А2КК	4,0		744	606	19	50
Контроль	8,4	48	1886	1115	41	100
А2КК	4,4		663	549	17	41
Контроль	8,0	32	1720	1169	32	100
А2КК	5,5		725	601	17	53

варьировать и в ряде случаев оказываться недостаточным, чтобы вызвать нарушение гидроксирования незамещенных пролиновых остатков. Следовательно, торможение образования оксипролина может служить показателем интенсивности включения аналога в полипептидные цепи коллагена. Справедливость этого положения подтверждается также результатами коллагеназного теста. При сравнении данных, представленных в табл. 1 и 2, видно, что торможение расщепления коллагена, синте-

Таблица 2

Расщепление бактериальной коллагеназой
 C^{14} -коллагена, синтезированного в присутствии А2КК
 (гидроксирование не нарушено)

Условия синтеза коллагена	Гидроксирование, %	Радиоактивность нерасщепленного белка, имп/мин на пробу		Количество расщепленного белка, %
		без коллагеназы	с коллагеназой	
Контроль	7,0	1269	878	31
А2КК	6,8	303	204	33
Контроль	7,0	1350	921	32
А2КК	7,2	376	275	27
Контроль	7,4	1378	922	33
А2КК	7,5	396	284	28
Контроль	6,3	4833	3636	25
А2КК	7,7	780	618	21

зированного в присутствии А2КК, наблюдается только в том случае, если одновременно с этим нарушается образование оксипролина. Однако сниженная способность коллагена, содержащего А2КК, расщепляться коллагеназой, по-видимому, связана не с уменьшением количества оксипролина, а с замещением остатков пролина коллагена в последовательности P—R—X—P, необходимой для действия бактериальной коллагеназы.

Полученные результаты, помимо характеристики свойств аномального коллагена, образованного в присутствии аналогов пролина, представляют также интерес для изучения субстратной специфичности бактериальных коллагеназ и выяснения роли в механизме их действия структуры пролиновых остатков коллагена.

Институт биологической и медицинской химии
 Академии медицинских наук СССР
 Москва

Поступило
 13 III 1972

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ T. Takeuchi, D. J. Prockop, *Biochim. et biophys. acta*, **175**, 142 (1969).
² Т. В. Замараева, А. Д. Бибилова, В. И. Мазуров, *Биохимия*, **34**, 136 (1969).
³ S. Seifter, P. M. Gallop, *The Proteins, Composition, Structure and Function*, **4**, 1966, p. 238. ⁴ T. Takeuchi, J. Rosenbloom, D. J. Prockop, *Biochim. et biophys. acta*, **175**, 156 (1969). ⁵ J. M. Lane, L. J. Parkers, D. J. Prockop, *Biochim. et biophys. acta*, **236**, 528 (1971). ⁶ K. Juva, D. J. Prockop, *Anal. Biochem.*, **15**, 77 (1966).