

В. Я. АЛЕКСАНДРОВ, В. Н. ВИТВИЦКИЙ, Г. А. ЛЕВДИКОВА

**ВЛИЯНИЕ ТЯЖЕЛОЙ ВОДЫ (D<sub>2</sub>O) НА УСТОЙЧИВОСТЬ  
ПРОКОЛЛАГЕНА К ТЕПЛОВОЙ ДЕНАТУРАЦИИ  
И К ДЕЙСТВИЮ КОЛЛАГЕНАЗЫ**

(Представлено академиком Е. М. Крепсом 22 XI 1974)

Нами было высказано мнение, что изменение устойчивости белка к тепловой денатурации и к гидролитическому действию протеиназ может служить косвенным показателем изменения конформационной гибкости белковых молекул (1, 2). В связи с этим важно выяснить, в какой мере данная модификация белка или изменение состава растворителя, меняющие конформационную гибкость белковых макромолекул, сходно отразятся на устойчивости их к нагреву и протеолизу. Хотя в литературе неоднократно указывалось на параллельное изменение этих обоих показателей, следует продолжить подобное сопоставление, так как имеются и противоречащие данные (смотри литературу в (1)).

В ряде работ показано, что замена в растворителе H<sub>2</sub>O на D<sub>2</sub>O повышает устойчивость белков к денатурации. Описано повышение устойчивости к мочеvine яичного альбумина (3), к нагреву лизоцима и дезоксирибонуклеазы (4), рибонуклеазы (5), кератина (6), коллагена (7), фикоцианина (8) актомиозина (9, 10). Стабилизация белков является причиной повышения устойчивости растительных, животных и бактериальных клеток к различным повреждающим воздействиям при более или менее полной замене в среде H<sub>2</sub>O на D<sub>2</sub>O (11). В данной работе сравнивалась устойчивость проколлагена (тропоколлагена), растворенного в D<sub>2</sub>O и H<sub>2</sub>O к денатурирующему действию нагрева и к протеолитическому действию коллагеназы.

Коллагеназа *Cl. histolyticum*, не содержащая измеримых количеств примесей неспецифических протеиназ, была получена из культуральной жидкости *Cl. histolyticum* по методу, описанному нами ранее (12). Цитратно-растворимый коллаген (проколлаген) был выделен из кожи белых крыс и лиофилизирован. Перед лиофилизацией проколлаген суспендировали в дистиллированной воде, либо растворяли в 0,25% уксусной кислоте.

Гексапептиды  $\alpha$ -гли-про-ала-гли-про-гли-ОСН и  $\alpha$ -гли-про-глю-гли-про-гли-ОСН были синтезированы в институте Молекулярной биологии АН СССР В. А. Шибневым.

Для приготовления трис-НСl буфера рН 7,6, содержащего 4% CaCl<sub>2</sub>, прокаленный CaCl<sub>2</sub> и трис растворяли в H<sub>2</sub>O и D<sub>2</sub>O, а затем оттитровывали до нужного рН концентрированной HCl. Для растворов в D<sub>2</sub>O рD вычисляли путем прибавления к величине, измеренной на потенциометре, 0,4 единиц. Расчеты показали, что при приготовлении буфера существенного разведения тяжелой воды не происходило. Используемые в опытах растворы содержали в конечном счете не менее 97–98% D<sub>2</sub>O. Ферментативную реакцию гидролиза проводили при 25° в 0,1 M трис-буфере, содержащем 2% CaCl<sub>2</sub>. Следует отметить, что проколлаген, подвергнутый лиофилизации нам не удавалось полностью растворить в нейтральном буфере, даже в присутствии CaCl<sub>2</sub>. Ввиду этого, для приготовления из лиофилизованного материала растворов проколлагена поступали следующим образом. К навескам белка добавляли растворы 0,25% уксусной кислоты, при-

готовленной из ледяной кислоты, растворенной в  $H_2O$  или  $D_2O$  и выдерживали в холодильнике в течение суток. В том случае, когда проколлаген был лиофилизирован из раствора 0,25% кислоты, для приготовления растворов добавляли  $D_2O$  и  $H_2O$  без кислоты. За сутки проколлаген полностью растворялся. Перед опытом полученные растворы разводили соответствующими объемами трис-буферов с  $CaCl_2$ . В целях соблюдения стандартности условий с синтетическими субстратами поступали подобным же образом.

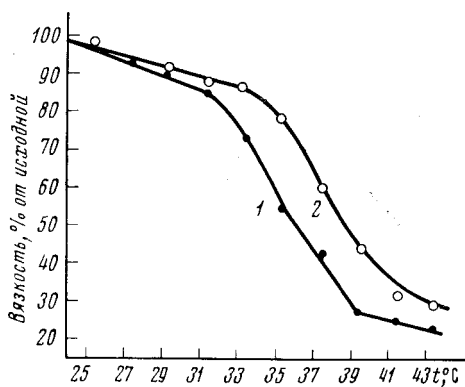


Рис. 1. Тепловая денатурация проколлагена, растворенного в  $H_2O$  (1) и в  $D_2O$  (2)

$H^+$  ионы титровали прибавлением приготовленного на  $H_2O$  или  $D_2O$   $8 \cdot 10^{-3} M$  раствора КОН. Термостатированная ячейка титратора содержала 5 мг проколлагена и 60  $\mu g$  коллагеназы в 5 мл 0,1 M раствора KCl в  $H_2O$  или  $D_2O$ , pH и pD которых были 7,6 в первой серии и 8,6 во второй серии опытов. Гидролиз проводили при 20° при постоянном перемешивании. В опытах с проколлагеном помимо этого был использован вискозиметрический метод.

Определение температуры тепловой денатурации проводили в вискозиметре Оствальда, помещенном в водяной термостат. Температура в термостате повышалась со скоростью 1–1,5° в мин. Температурный порог денатурации определяли по положению точки перегиба кривой зависимости относительной вязкости от температуры. Растворы проколлагена для этой процедуры готовили так, как описано выше, а затем дополнительно разводили соответствующим 0,1 M трис-буфером, содержащим 2%  $CaCl_2$  до концентрации 0,1%. В опытах, посвященных исследованию влияния тепловой денатурации на вязкость проколлагена, вискозиметры с растворами белка в  $H_2O$  и  $D_2O$  помещались одновременно в один и тот же термостат.

Как видно из рис. 1, тепловая денатурация проколлагена, растворенного в тяжелой воде, начиналась при более высокой температуре, чем в случае с  $H_2O$ . Разница составляла в разных опытах от 2,5 до 3°. Эти данные близки к результатам, полученным в (7) для коллагена кожи и сухожилий, а также в (14) для охлажденных растворов желатины.

Сравнительное исследование скоростей ферментативного расщепления проколлагена показало, что проколлаген, растворенный в  $D_2O$ , гидролизует медленнее чем в  $H_2O$ . О степени расщепления проколлагена судили по нарастанию аминного азота в реакционной смеси (нигидриновая реакция) (рис. 2A), по титрованию выделяющихся в процессе гидролиза  $H^+$  ионов (рис. 2B), а также по уменьшению вязкости раствора в вискозиметре Оствальда (рис. 2B). Во всех случаях получены сходные результаты. Как указывалось выше, проколлаген был выдержан в тяжелой воде в течение суток. Более продолжительное выдерживание (до 5 дней) не меняло общей картины.

Снижение скорости протеолиза в  $D_2O$  может быть результатом стабилизации вторичной или третичной структуры проколлагена, следствием влияния  $D_2O$  на фермент или на взаимодействие его с субстратом. Точно расчленить указанные возможности нелегко. Однако некоторое уточнение можно получить, исследовав влияние  $D_2O$  на гидролитическое расщепление коллагеназой синтетических субстратов, лишенных вторичной и третичной структуры.

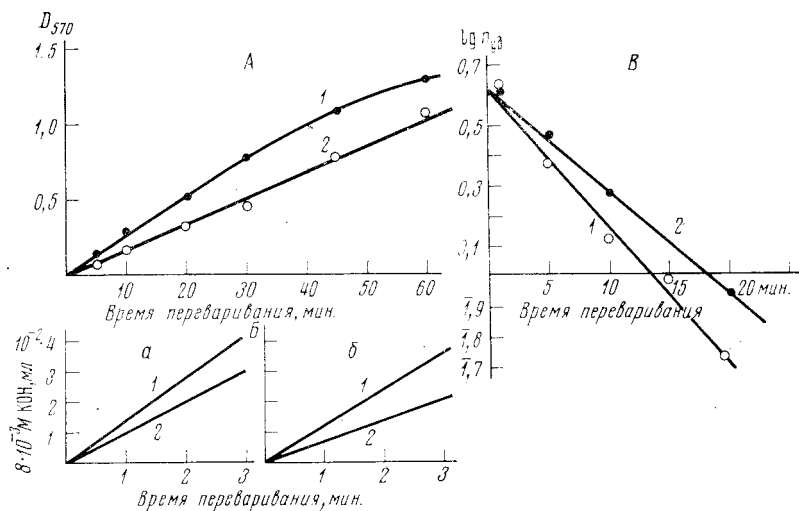


Рис. 2. Действие коллагеназы на проколлаген. 1 — растворитель  $H_2O$ , 2 — растворитель  $D_2O$ . А — коллагеназа 40  $\mu\text{г}/\text{мл}$ , проколлаген — 2,5  $\text{мг}/\text{мл}$ . Б — коллагеназа 12  $\mu\text{г}/\text{мл}$ , коллаген 1  $\text{мг}/\text{мл}$ . Объем реакционной смеси 5  $\text{мл}$ . а — рН, рD 7,6; б — рН, рD 8,6. В — коллагеназа 40  $\mu\text{г}/\text{мл}$ , проколлаген — 1,0  $\text{мг}/\text{мл}$

С этой целью было использовано два гексапептида, указанные в методической части. При действии коллагеназы на синтетические пептиды, растворенные в  $H_2O$  и  $D_2O$ , мы не обнаружили снижения скорости ферментативной реакции в  $D_2O$ . В трех сериях опытов синтетические субстраты гидролизировались в  $D_2O$  несколько быстрее, чем в  $H_2O$ . В одном опыте разница не обнаружена. Интерпретация этих фактов в настоящее время затруднительна. Однако, результаты, полученные с синтетическими субстратами, позволяют считать более вероятным, что повышенные устойчивости проколлагена в  $D_2O$  к коллагеназе, так же, как и к нагреву, является результатом повышения жесткости молекул проколлагена в тяжелой воде. Эти данные хорошо согласуются с ранее установленным параллельным изменением в филогенезе устойчивости коллагена к нагреву и к протеиназам. Известно, что проколлагены, взятые от видов животных, обитающих при разной температуре, соответственно отличаются друг от друга по своей устойчивости к денатурирующему действию нагрева. В то же время более термостабильные проколлагены оказались более устойчивыми и к протеолитическому действию коллагеназы (<sup>15</sup>, <sup>16</sup>). Параллельное изменение в филогенезе устойчивости к нагреву и протеолизу описано и на ряде других белков (смотри литературу в (<sup>17</sup>)).

Ботанический институт им. В. Л. Комарова  
Академии наук СССР  
Ленинград

Поступило  
30 X 1974

Московский государственный университет  
им. М. В. Ломоносова

Институт эпидемиологии и микробиологии  
им. Н. Ф. Гамалеи  
Академии медицинских наук СССР  
Москва

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> В. Я. Александров, Усп. совр. биол., т. 67, 3, 383 (1969). <sup>2</sup> V. Ya. Alexandrov, Currents in Modern Biology, v. 3, 9 (1969). <sup>3</sup> R. H. Maybury, J. J. Katz, Nature, v. 177, 629 (1956). <sup>4</sup> D. Shugar, E. Gajewska, J. Polymer Sci., v. 31, 123, 281 (1958). <sup>5</sup> J. Hermans, H. A. Scheraga, Biochim. et biophys. acta, v. 36, 2, 534 (1959). <sup>6</sup> M. Feughelman, A. R. Haly, T. W. Mitchell, Textile Res., v. 29, 564 (1959). <sup>7</sup> B. J. Rigby, Biochim. et biophys. acta, v. 62, 183 (1962). <sup>8</sup> D. S. Berns, Biochemistry, v. 2, 6, 1377 (1963). <sup>9</sup> В. Я. Александров, Н. П. Арронет и др., Цитология, т. 6, 6, 667 (1964). <sup>10</sup> V. Ya. Alexandrov, N. J. Arronet et al., Federat. Proc., v. 25, № 1, Part II, T. 128 (1966). <sup>11</sup> Е. И. Денько, Усп. совр. биол., т. 70, 4, 41 (1970). <sup>12</sup> Т. А. Левдинова, Биохимия, т. 31, 4, 821 (1966). <sup>13</sup> E. W. Yemm, E. C. Cocking, Analyst, v. 80, 209 (1955). <sup>14</sup> W. F. Harrington, P. H. Hippel, Arch. Biochem. and Biophys., v. 92, 1, 100 (1961). <sup>15</sup> О. В. Казакова, В. Н. Орехович, В. О. Шпикитер, ДАН, т. 120, № 2, 359 (1958). <sup>16</sup> В. Я. Александров, А. П. Андреева, Цитология, т. 9, 10, 1288 (1967). <sup>17</sup> В. Я. Александров, Клетки, макромолекулы и температура, «Наука», 1975.