

Физические факторы стабильности трехспиральных структур коллагенового типа

Е. П. Борискина, Т. В. Больбух, М. А. Семенов, В. Я. Малеев

Институт радиофизики и электроники им. А. Я. Усикова НАН Украины
Ул. Академика Проскуры, 12, Харьков, 61085, Украина
yupmelezhnik@yahoo.com

Вычислены энтальпия межпептидных водородных связей и энергия гидратации коллагена, а также модельного коллагенового политрипептида poly(Gly-Pro-Pro) и определены относительные вклады энергий взаимодействий различных типов в общую энергию стабилизации трехспиральных структур коллагенового типа. Расчет проводили на основании данных комплекса экспериментальных физических методов: ИК спектроскопии, пьезограмметрии и дифференциальной сканирующей калориметрии.

Ключевые слова: коллаген, poly(Gly-Pro-Pro), энергия гидратации, энтальпия водородных связей, ИК спектроскопия.

Введение. Фибриллярный белок коллаген образует основу соединительной ткани у млекопитающих. Понимание принципов структурной организации коллагена и физических факторов, определяющих его стабильность, является важной и актуальной задачей. Это, в частности, связано с тем, что точечные мутации в генах, кодирующих аминокислотную последовательность коллагена, часто приводят к изменениям физических свойств коллагеновых фибрилл и влекут за собой тяжелые заболевания, такие как синдром Эллерса-Данлоса, синдром Марфана и др.

Основной структурной единицей коллагена являются стержнеобразные молекулы тропоколлагена, представляющие собой правые тройные суперспирали, скрученные из трех первичных левых спиралей типа полипролина II, построенных из повторяющихся фрагментов -Gly-X-Y-, где X = Pro в 37,8 % случаев, а Y = 4-Hyp в 28,8 % случаев [1, 2].

К факторам, обеспечивающим стабильность коллагеновых молекул, относят межпептидные водородные связи, водородные связи групп C=O с молекулами воды, гидрофобные и Ван-дер-Ваальсовы взаимодействия.

Согласно данным рентгенструктурного анализа (РСА), полученным на небольших фрагментах молекул природного коллагена [3, 4] и модельных коллагеновых пептидах, состоящих из гомотрипептидных участков -Gly-Pro-Hyp- или -Gly-Pro-Pro- [5—7], структура водородных связей в трехспиральной молекуле тропоколлагена такова: между группами N₁H₁ остатков глицина одной цепи и группами C₂O₂ остатков аминокислот, находящихся в положении X соседней полипептидной цепи, образуется сеть межпептидных водородных связей; группы C₁O₁ глицина связываются с одной, а группы C₃O₃ аминокислот в положении Y — с двумя молекулами воды. При этом полярные боковые радикалы и NH-группы аминокислот также образуют водородные связи с водой, причем в иминокислотно-дефицитных участках коллагена формирует-

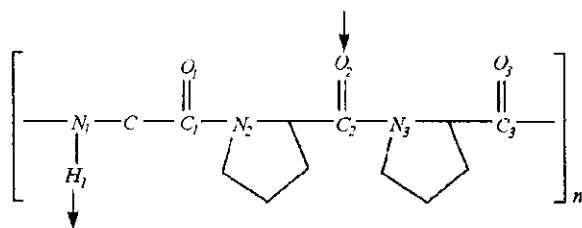


Рис. 1. Структура политрипептида poly(Gly-Pro-Pro). Группы CO и NH(N) повторяющегося фрагмента -Gly-Pro-Pro- обозначены следующим образом: N_1H_1 и C_1O_1 принадлежат глицину; N_2 и C_2O_2 — пролину в положении X; N_3 и C_3O_3 — пролину в положении Y. Атомы, участвующие в образовании межпептидной $N_1H_1 \dots C_2O_2$ водородной связи, показаны стрелками

ся регулярная сеть водородных связей групп N_2H_2 одной цепи и групп C_1O_1 соседней цепи, посредниками в которой выступают молекулы воды (рис. 1).

По данным РСА, кроме внутреннего слоя гидратной оболочки, содержащего в среднем три молекулы воды на трипептид и расположенного на расстоянии 2,7 Å от ближайших C=O-групп политрипептида, имеется также наружный слой гидратной оболочки, молекулы которого образуют водородные связи с водой внутреннего слоя и расположены на расстоянии 3,6 Å от тропоколлагеновой молекулы [5]. Подобные данные о количестве молекул воды в гидратной оболочке коллагеновых белков получены с использованием калориметрии и гравиметрии коллагена и рассчитаны теоретически методом Монте-Карло [8, 9]. С использованием ИК спектроскопии на примере модельного коллагенового трипептида (Gly-Pro-Pro)₈ выявлено, что процесс гидратации коллагеновых полипептидов носит многоступенчатый характер и сопровождается изоморфной перестройкой трехспиральной структуры. При этом процесс кристаллизации или упорядочения структуры происходит после посадки 5—6 молекул воды на каждый трипептид [10].

Многочисленными работами, посвященными исследованию термодинамических характеристик коллагена, выявлено, что стабильность трехспиральных коллагеновых молекул определяется как их аминокислотным составом, так и степенью гидратации [11]. Так, в работе [12] получено, что величина энтальпии плавления политрипептида poly(Gly-Pro-Hyp) в ~2 раза превышает энтальпию денатурации политрипептида poly(Gly-Pro-Pro) (3 и 1,77 ккал/моль на -Gly-X-Y- фрагмент соответственно). Это связывают с тем, что эти два политрипептида наряду с общими стабилизирующими факторами, такими как наличие межпептидных

водородных связей и водородных связей с водой, различаются иминокислотой в положении Y. Конформация кольца гидроксипролина благодаря установлению $n-\pi^*$ связей между кислородом и углеродом соседних пептидных групп и *gauche*-эффекту [13, 14] является стерически более благоприятной для образования тройной спирали и реализации контактных Ван-дер-Ваальсовых взаимодействий [15, 16]. Кроме того, группа OH гидроксипролина может образовывать дополнительные водородные связи с водой [17].

Количество связываемой коллагеном воды значительно изменяет условия его денатурации. Так, с использованием дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) природного коллагена [18] установлено, что при максимальной дегидратации коллагена, соответствующей 0,07 моль воды/моль -Gly-X-Y-, температура денатурации принимает максимальные (до 210 °С), а энтальпия денатурации — минимальные (0,7 ккал/моль -Gly-X-Y-) значения. В полностью гидратированном состоянии значение температуры денатурации уменьшается до 41,1 °С, а энтальпия денатурации возрастает до 3,6 ккал/моль -Gly-X-Y- фрагмента. Энтальпия денатурации дегидратированного коллагена обусловлена разрывом межпептидных водородных связей, которые, как известно из РСА, в обезвоженном коллагене сохраняются [19]. В гидратированном образце высокие значения энтальпии перехода спираль—клубок объясняются разрушением высокоупорядоченной гидратной оболочки коллагена, сопровождающим разрыв межпептидных водородных связей $N_1H_1 \dots C_2O_2$.

Таким образом, накопленные экспериментальные данные и теоретические модели свидетельствуют о том, что межпептидные водородные связи и молекулы гидратной воды играют важную роль в формировании коллагеновых структур. Однако энергии межпептидных водородных связей и энергии гидратации трехспиральных структур до сих пор количественно не определены. В то же время такие сведения позволили бы более полно понять физическую природу стабилизации спиральных структур коллагенового типа.

Цель настоящей работы состояла в вычислении энтальпии межпептидных водородных связей и энергии гидратации у коллагена и модельного коллагенового политрипептида poly(Gly-Pro-Pro), а также в определении относительных вкладов энергий взаимодействий различных типов в общую

энергию стабилизации трехспиральных структур коллагенового типа.

Для расчета использованы данные комплекса физических методов (ИК спектроскопии, пьезограви́метрии и калориметрии). Применяемый подход разработан ранее для исследования гидратации и структурных переходов нуклеиновых кислот [20, 21].

Материалы и методы. В работе использовали коллаген типа I из кожи телят, лиофилизированный, кислоторастворимый (С9791, «Sigma», США), лиофильно высушенный коллаген из сухожилий хвостов крыс линии Wistar, выделенный на кафедре биохимии Харьковского национального университета им. В. Н. Каразина по стандартной методике [22], модельный коллагеновый политрипептид poly(Gly-Pro-Pro) фирмы «Sigma» (P6665). Для проведения дейтерообмена применен оксид дейтерия (D₂O) с 99,84 % изотопным замещением.

Приготовление образцов для ИК спектроскопии и пьезограви́метрии. Политрипептид poly(Gly-Pro-Pro) растворяли в воде при концентрации 3,5 мг/мл. Коллаген растворяли в 0,01 молярном растворе HCl и нейтрализовали добавлением буферной смеси, содержащей гидроксиметиламинометан, NaCl, KH₂PO₄/K₂HPO₄ буфер и H₂O. Концентрация коллагена в конечном растворе составляла 2,5 мг/мл, pH 7,45.

ИК спектроскопия. Образцами для ИК спектроскопии служили пленки poly(Gly-Pro-Pro) и коллагена, осажденные из полученных растворов на окошках из CaF₂. Для изучения процесса гидратации пленки вначале полностью высушивали вакуумной откачкой кювет, затем увлажняли до заданных значений относительной влажности (ОВ) в диапазоне 0—86 %, инкубируя их в атмосфере паров насыщенных растворов различных солей в H₂O и D₂O [23]. ИК спектры сухих и увлажненных пленок исследуемых веществ записывали с помощью двухлучевого спектрометра UR-20 («Karl Zeiss», Jena, Германия) с использованием призмы NaCl при комнатной температуре. Спектр записывали в интервале частот 900—3700 см⁻¹, в котором поглощают сорбированная вода и колебательные группы исследуемых веществ, чувствительные к гидратации и структурному состоянию коллагеновой молекулы [24].

Пьезограви́метрия. Изотермы гидратации poly(Gly-Pro-Pro) и коллагена получали на пьезограви́метрической установке, описанной в [25]. При

этом пленки poly(Gly-Pro-Pro) и коллагена полностью высушивали, затем увлажняли до заданных значений ОВ в диапазоне 0—95 %, дозированно подавая пары воды. Измерения проводили при T = 20 °С. Изотермы гидратации записывали в виде зависимости $n(ОВ \%)$, где n — количество сорбируемой образцом воды (моль H₂O/моль трипептидов -Gly-X-Y- сорбента). Значения n при различных уровнях ОВ определяли по формуле

$$n = \frac{M_{\text{Gly-X-Y}} \cdot \Delta f_i - \Delta f_m}{M_{\text{H}_2\text{O}} \cdot \Delta f_m}, \quad (1)$$

где $M_{\text{Gly-X-Y}}$ и $M_{\text{H}_2\text{O}}$ — молекулярные массы трипептида -Gly-X-Y- и воды соответственно; Δf_i — разность частот опорного и измерительного кварцевого резонатора при i -й влажности; Δf_m — изменение разностной частоты, вызванное сухим образцом. Погрешность составляла $\pm 0,1$ моль H₂O на 1 моль -Gly-X-Y-.

Калориметрия. Кривые теплопоглощения сухих и увлажненных образцов коллагена из хвостов крыс записывали с использованием дифференциального сканирующего микрокалориметра DSC-101 («Setaram», Франция). Подробности эксперимента описаны в [26].

Результаты и обсуждение. На рис. 2 представлены результаты пьезограви́метрии политрипептида poly(Gly-Pro-Pro) и коллагена. Кривая 1 (рис. 2, а, б) — отражает изотерму гидратации. Видно, что уровень сорбции воды при одинаковых значениях ОВ у коллагена несколько выше, чем у политрипептида.

Для более полного анализа результатов пьезограви́метрии образцов экспериментальные изотермы гидратации аппроксимировали с помощью модифицированного уравнения Д'Арси и Ватта [25], учитывающего гетерогенность адсорбента:

$$V(i) = \frac{V_m \cdot a_L \cdot i}{1 + a_L \cdot i} + a_H \cdot i + \frac{b \cdot i}{1 - b \cdot i}, \quad (2)$$

где i — относительная влажность; 1-е слагаемое описывает стадию адсорбции молекул воды по закону Лэнгмюра; 2-е — адсорбцию молекул воды по закону Генри и 3-е — мультислойную адсорбцию; V_m — емкость монослоя; a_L , a_H и b — активности воды соответственно на стадиях лэнгмюровской, генриевской и мультислойной адсорбции.

Результаты разложения приведены на рис. 2, а, б (кривые 2—4). Найденные в ходе разложения

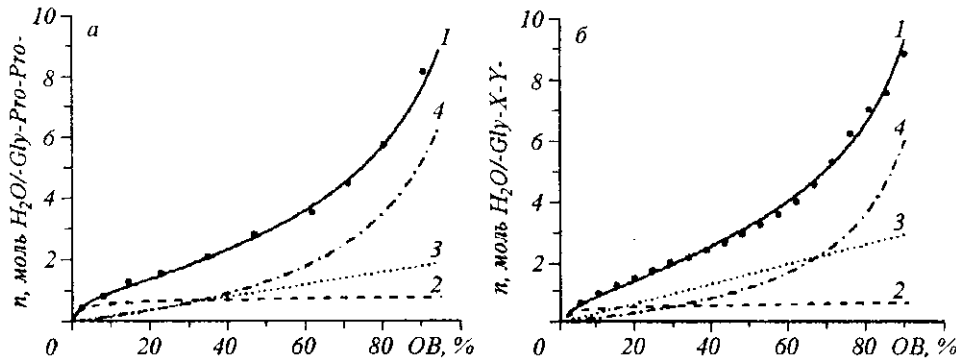


Рис. 2. Результаты пьезограви- метрии poly(Gly-Pro-Pro) (а) и коллагена (б): изотермы гидратации (1), кривая лэнгмюровской (2), генриевской (3) и мультислойной (4) адсорбции, полученные при разложении изотерм с использованием модифициро- ванного уравнения Д'Арси и Ватта

Таблица 1
Параметры модифицированного уравнения Д'Арси и Ватта, полученные при разложении изотерм гидратации poly(Gly-Pro-Pro) и коллагена

Вещество	V_m	a_L	a_H	b
Poly(Gly-Pro-Pro)	$0,81 \pm 0,05$	$39,9 \pm 0,02$	$2,01 \pm 0,05$	$0,89 \pm 0,02$
Коллаген	$0,52 \pm 0,05$	$43,2 \pm 0,02$	$2,98 \pm 0,05$	$0,89 \pm 0,02$

Примечание. V_m — емкость монослоя; a_L , a_H и b — активности воды на стадиях лэнгмюровской, генриевской и мультислойной адсорбции соответственно.

параметры уравнения Д'Арси и Ватта представле- ны в табл. 1.

Из рис. 2, а, б, видно, что при 90 % ОВ первый гидратный слой, в котором молекулы воды сорбируются по законам Лэнгмюра и Генри, у полипептида и коллагена состоит соответственно из $2,5 \pm 0,1$ и $3,2 \pm 0,1$ молекул воды. Эти молекулы воды образуют наиболее прочные водородные связи с гидратноактивными центрами исследуемых веществ.

Используя параметры модифицированного уравнения Д'Арси и Ватта, полученные при разло- жении изотерм гидратации, можно найти теплоту адсорбции $\Delta Q = R \cdot T \cdot \ln(K_i/K_L) + T \cdot \Delta S_i$ для адсорб- ционных слоев Лэнгмюра и Генри (ΔQ_L и ΔQ_H) соответственно, энтальпию и энергию гидратации $\Delta H_{hydr} = \Delta E_{hydr} = -\Sigma \Delta Q_i$ poly(Gly-Pro-Pro) и колла- гена. Константы адсорбционного равновесия Лэнг- мюра, Генри и полимолекулярной адсорбции в реакции [пар + вещество \rightarrow единичный комплекс], K_i , могут быть найдены по формуле $K_i = a \cdot K_w$, где K_w — константа конденсации воды [насыщенный пар \rightarrow жидкость]. Отметим, что при таком методе расчета величины ΔQ_i в каждом адсорбционном

слое i являются разностью между полной теплотой адсорбции вода—адсорбент и теплотой конденса- ции молекул воды. Таким образом, величины ΔH_{hydr} и ΔE_{hydr} также являются разностными (избы- точными) энтальпией и энергией гидратации соот- ветственно.

К сожалению, используемый нами подход не позволяет оценить изменение энтропии системы ΔS_i при взаимодействии молекул воды с полимер- ной молекулой, однако, согласно [27], ее величина близка к нулю. При определении общей теплоты адсорбции воды не учитывали вклада воды при полимолекулярной адсорбции, так как константы адсорбции b для коллагена и poly(Gly-Pro-Pro) близки к единице.

Рассчитанные таким образом теплоты адсорб- ции и общая энтальпия гидратации политрипепти- да и коллагена приведены в табл. 2.

Видно, что суммарная энтальпия гидратации коллагена ΔH_{hydr} по абсолютному значению в 1,12 раза превышает таковую политрипептида. При этом величины ΔQ_L у исследуемых образцов прак- тически не отличаются, а ΔQ_H у коллагена в 1,6 раза выше, чем у политрипептида. Различия в гидратации образцов можно связать с увеличением числа гидрофильных участков у коллагена при замещении части иминокислот в положениях X и Y различными аминокислотами, при этом к допол- нительным центрам гидратации можно отнести гидрофильные аминокислотные радикалы и N-H группы в составе пептидных групп аминокислот.

Учитывая полученные при пьезограви- метрии данные о количестве молекул воды во внутреннем слое гидратной оболочки образцов, можно рассчи- тать, что средняя энтальпия водородной связи пеп- тид—вода poly(Gly-Pro-Pro) и коллагена составля- ет соответственно $-4,3$ и $-3,9$ кДж/моль.

Таблица 2

Теплоты адсорбции воды (кДж/моль фрагмента -Gly-X-Y-) по законам Лэнгмюра и Генри, ΔQ_L и ΔQ_H соответственно

Вещество	ΔQ_L	ΔQ_H	ΔH_{hydr}
Poly(Gly-Pro-Pro)	$9,2 \pm 0,02$	$1,7 \pm 0,01$	$-10,9 \pm 0,04$
Коллаген	$9,5 \pm 0,02$	$2,7 \pm 0,01$	$-12,2 \pm 0,04$

Мы сравнили полученные значения общей энтальпии гидратации коллагена и poly(Gly-Pro-Pro) с известными данными литературы. В работе [28] рассчитанные величины свободной энергии водородных связей C=O...H-O-H у N-метилацетамида и водородных связей вода—вода составляют $-31,78$ и $-27,59$ кДж/моль соответственно. Таким образом, величина разностной энергии гидратации равна $-4,19$ кДж/моль и близка к рассчитанным нами значениям.

Для детального исследования гидратации poly(Gly-Pro-Pro) и коллагена, а также структурных переходов, сопровождающих этот процесс, проведено ИК спектроскопическое исследование пленок образцов в широком диапазоне значений ОВ. Полученные ИК спектры представлены на рис. 3. Из анализа спектров можно видеть, что формирование гидратной оболочки исследуемых веществ, происходящее с ростом ОВ, сопровождалось значительными изменениями спектральных параметров основных полос поглощения.

Подробный анализ спектров осуществляли путем построения кривых зависимости частот ν (см^{-1}) основных амидных полос от ОВ (%) и n , где n — количество молекул воды, сорбируемых одним фрагментом -Gly-X-Y-; n определяли на основании изотерм гидратации (см. выше). Кривые $\nu(\text{ОВ})$ и $\nu(n)$ построены для полос поглощения Амид I, Амид II и Амид II' (рис. 4). Группы атомов, колебания которых обуславливают появление данных полос, как известно из РСА модельных коллагеновых структур, участвуют в образовании межпептидных водородных связей и водородных связей с молекулами воды [3, 5, 6]. Так как в полосу Амид I в недегидратированном состоянии вносит вклад поглощение, обусловленное деформационными колебаниями ОН-групп молекул воды, анализ полосы Амид I проводили для влажных пленок дегидратированных образцов. Анализ зависимостей $\nu(\text{ОВ})$ и $\nu(n)$ для полос Амид I, Амид II и Амид II' poly(Gly-Pro-Pro) и коллагена представлен ниже.

Гидратация образцов ведет к низкочастотному

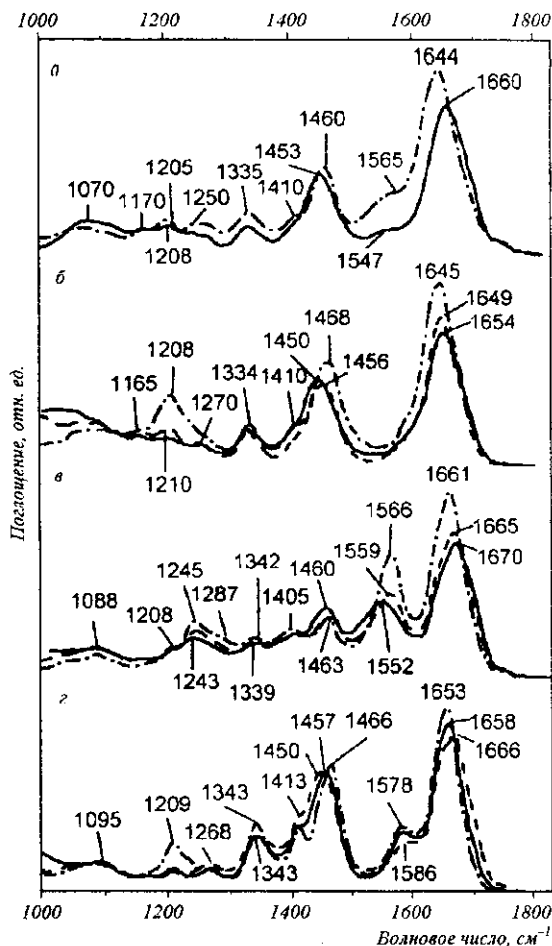


Рис. 3. ИК спектры сухих и увлажненных пленок образцов в атмосфере легкой и тяжелой воды: а — poly(Gly-Pro-Pro) в H_2O ; б — poly(Gly-Pro-Pro) в D_2O ; в — коллаген в H_2O ; г — коллаген в D_2O ; сплошная линия соответствует 0 % ОВ, штриховая линия — 15 % ОВ, штрих-пунктирная линия — 76 % ОВ

сдвигу полосы Амид I (рис. 4, а, г), максимальные значения которого $\Delta\nu = -9 \text{ см}^{-1}$ для poly(Gly-Pro-Pro) и $\Delta\nu = -13 \text{ см}^{-1}$ для коллагена достигаются уже при сорбции трех молекул воды каждым -Gly-X-Y-фрагментом, и росту ее интенсивности (рис. 3, б, г). С учетом данных РСА [3, 5, 6] эти спектральные изменения можно связать с формированием межпептидных водородных связей и Н-связей карбонильных групп глицина C_1O_1 и пролина C_3O_3 с молекулами воды (рис. 1). Полосы поглощения Амид II и Амид II' при увеличении степени гидратации образца претерпевают высокочастотный сдвиг соответственно на $\Delta\nu = 17$ и 18 см^{-1} у poly(Gly-Pro-Pro) и $\Delta\nu = 14$ и 16 см^{-1} для коллагена (рис. 4, б, в, д, е). Насыщение частотных сдвигов данных полос, как и в случае полосы Амид I,

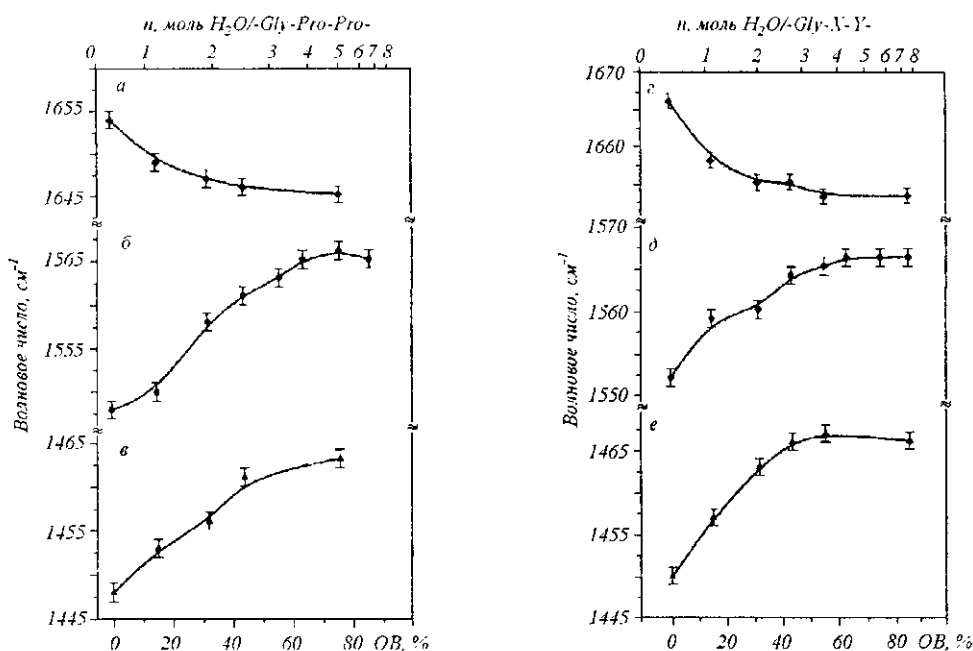


Рис. 4. Частоты полос Амид I, Амид II, Амид II' политрипептида poly(Gly-Pro-Pro) (а, б, в) и коллагена (г, д, е) в условиях различных значений относительной влажности в атмосфере H₂O и D₂O. Оси абсцисс представляют собой уровень гидратации образца: верхняя (n) показывает число молекул воды, сорбирующейся одним молем трипептида -Gly-X-Y-, нижняя (ОВ %) — относительную влажность. Зависимость n(ОВ) найдена на основании изотерм гидратации

происходит при сорбции первых трех молекул воды каждым -Gly-Pro-Pro- фрагментом политрипептида и четырех молекул воды каждым -Gly-Pro-Pro- фрагментом коллагена.

Известно, что высокочастотный сдвиг полос поглощения, отнесенный к деформационным колебаниям атомов, наблюдается при формировании данными атомными группами водородных связей. Основной вклад в поглощение в области Амид II (Амид II') вносят деформационные колебания групп NH (ND) [29, 30]. В случае poly(Gly-Pro-Pro) такие группы присутствуют только в составе пептидных групп глицина, так как пролин является иминокислотой. По данным PCA, в сухом poly(Gly-Pro-Pro) межпептидные N₁H₁...C₂O₂ водородные связи сохраняются [31], следовательно, высокочастотный сдвиг полосы Амид II, наблюдаемый при увлажнении poly(Gly-Pro-Pro), можно связать с усилением N₁H₁(N₁D₁)...C₂O₂ межпептидных водородных связей, которое сопровождается структурную перестройку тройной спирали при формировании гидратной структуры политрипептида. Сходное явление упрочнения сетки межпептидных связей в полипептиде (Gly-Pro-Pro)₈ при гидратации описано в работе [24].

В случае коллагена в область поглощения Амид II вносят вклад колебания групп N-H не только глицина, но и аминокислот, замещающих

пролин и гидроксипролин в положениях X и Y, поэтому высокочастотный сдвиг полосы Амид II, наблюдаемый при увлажнении, следует связать не только с усилением межпептидной водородной связи, но и с формированием водородных связей N-H-групп аминокислот с молекулами воды. Можно также предположить, что низкочастотные сдвиги полосы Амид I при гидратации коллагена и poly(Gly-Pro-Pro) отражают не только образование водородных связей карбонильных групп с водой, но и упрочнение межпептидных водородных связей.

Таким образом, наблюдаемые при гидратации изменения в ИК спектре poly(Gly-Pro-Pro) и коллагена позволяют сделать вывод о том, что в процессе гидратации образца наиболее прочно с группами C=O политрипептида связываются 3—4 молекулы воды на каждый -Gly-X-Y- фрагмент, которые, по-видимому, образуют внутренний слой гидратной оболочки политрипептида; гидратация образца сопровождается структурной перестройкой тройной спирали и упрочнением межпептидной водородной связи.

Для определения влияния гидратации на конформационное состояние трехспиральной коллагеновой молекулы были рассчитаны значения отношения R пиковых интенсивностей полос поглощения Амид III и 1450 см⁻¹ при различных уровнях ОВ, поскольку известно, что для нативного колла-

гена $R \geq 1,38$ [32]. Полученная зависимость $R(n)$ показана на рис. 5. Видно, что показатель R достигает значения 1,38 в условиях $OB \geq 70\%$, соответствующих сорбции 4–5 молекул воды на $-Gly-X-Y-$ фрагмент. Это свидетельствует о том, что при $OB \geq 70\%$ вызванный гидратацией конформационный переход коллагена завершается и его молекулы приобретают свою нативную трехспиральную конформацию.

На основании данных ИК спектроскопии, пьезограмметрии, ДСК и расчета частот компонент полосы Амид I коллагеновых белков, проведенного ранее с учетом резонансных взаимодействий карбонильных колебаний [33, 34], можно количественно определить энтальпии межпептидной водородной связи $N_1-H_1...O_2=C_2$ в $poly(Gly-Pro-Pro)$ и коллагене. При расчетах нами использовано несколько подходов, в которых учтены данные различных методов. Результаты приведены ниже.

1. Энтальпию межпептидной водородной связи $N_1-H_1...O_2=C_2$ в $poly(Gly-Pro-Pro)$ можно вычислить теоретически на основе данных о частотном сдвиге колебания соответствующей карбонильной группы при ее переходе из свободного состояния в водородносвязанное. Для этого воспользуемся найденной в работе [35] эмпирической зависимостью энтальпии водородной связи ΔH_{H-bond} , образуемой карбонильной группой, от $\Delta\nu_{H-bond}$, частотного сдвига колебания $C=O$ группы при образовании соответствующей H-связи:

$$\Delta H_{H-bond} = C \cdot \Delta\nu_{H-bond} \text{ (кДж/моль)}, \quad (3)$$

где $C = 0,205 \text{ кДж} \cdot \text{см}^{-1} \cdot \text{моль}^{-1}$.

Величина частотного сдвига валентного колебания карбонильной группы C_2O_2 за счет образования межпептидной водородной связи вычислена нами в [33] с учетом резонансных взаимодействий карбонильных колебаний: $\Delta\nu_{H-pept} = -37 \text{ см}^{-1}$. Такой величине, согласно уравнению (3), соответствует энтальпия водородной связи $N_1-H_1...O_2=C_2$ $\Delta H_{H-pept} = -7,6 \pm 1,0 \text{ кДж/моль}$.

Энтальпия межпептидной водородной связи $N_1-H_1...O_2=C_2$ в $poly(Gly-Pro-Pro)$ может быть найдена также с использованием результатов ИК спектроскопии. Для этого представим полную энтальпию водородной связи $N_1-H_1...O_2=C_2$ как $\Delta H_{H-pept} = \Delta H_{dry} + \Delta H_{dry \rightarrow wet}$, где ΔH_{dry} и $\Delta H_{dry \rightarrow wet}$ — это энтальпия водородной связи $N_1-H_1...O_2=C_2$ в сухом политрипептиде и значение роста данной энтальпии при конформационном переходе, сопровожда-

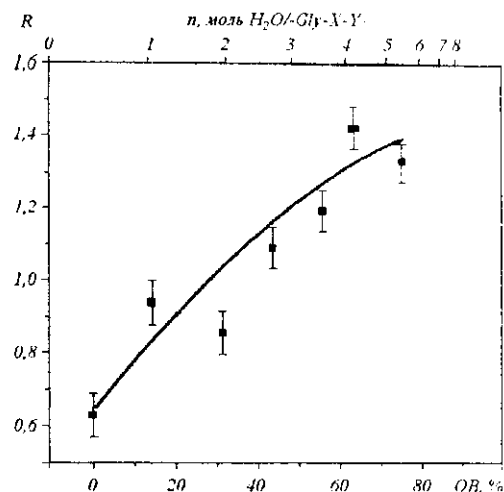


Рис. 5. Отношение $R(n)$ пиковых интенсивностей полос поглощения Амид III и 1450 см^{-1} при различных значениях OB . Оси абсцисс представляют уровень гидратации образца: верхняя (n) показывает число молекул воды, сорбирующейся одним молекул трипептида $-Gly-X-Y-$, нижняя ($OB\%$) — относительную влажность. Зависимость $n(OB)$ найдена на основании изотерм гидратации

ющем гидратацию образца соответственно. Величину ΔH_{dry} можно определить из формулы (3), где $\Delta\nu_{H-pept} = \Delta\nu_{dry} = \nu_0 - \nu_{dry}$ — это сдвиг между частотой колебания группы C_2O_2 в свободном состоянии и в дегидратированном трехспиральном $poly(Gly-Pro-Pro)$ соответственно $\nu_0 = 1693 \text{ см}^{-1}$ и $\nu_{dry} = 1664 \pm \pm 2 \text{ см}^{-1}$ [16]. Таким образом, получаем: $\Delta\nu_{dry} = -28 \pm 2 \text{ см}^{-1}$ и $\Delta H_{dry} = -5,74 \pm 0,4 \text{ кДж/моль}$. Частотный сдвиг максимума полосы Амид I при гидратации $\Delta\nu_{dry \rightarrow wet} = -9 \text{ см}^{-1}$ (рис. 4, з). Из уравнения (3) следует, что $\Delta H_{dry \rightarrow wet} = -1,84 \pm 0,2 \text{ кДж/моль}$. Итак, полная энергия межпептидной водородной связи $N_1-H_1...O_2=C_2$ в $poly(Gly-Pro-Pro)$ $\Delta H_{H-pept} = -7,58 \pm 1,2 \text{ кДж/моль}$. Этот результат близок к теоретически рассчитанному значению.

2. Энтальпию межпептидной водородной связи коллагена можно также рассчитать на основании данных ИК спектроскопии и зависимости энтальпии плавления коллагена ΔH от степени его гидратации, полученной ранее с помощью ДСК и опубликованной в работе [26]. Зависимость $\Delta H(n)$, где n — число молекул воды на моль $-Gly-Pro-Pro-$ фрагмента, представлена на рис. 6.

Полную энтальпию межпептидной водородной связи $N_1-H_1...O_2=C_2$ в коллагене, как и в $poly(Gly-Pro-Pro)$, можно представить в виде следующей суммы: $\Delta H_{H-pept} = \Delta H_{dry} + \Delta H_{dry \rightarrow wet}$. Значение ΔH_{dry} возможно найти по кривой $\Delta H(n)$, где $\Delta H_{dry} = \Delta H(0) = -2,93 \pm 0,4 \text{ кДж/моль}$. Частотный сдвиг

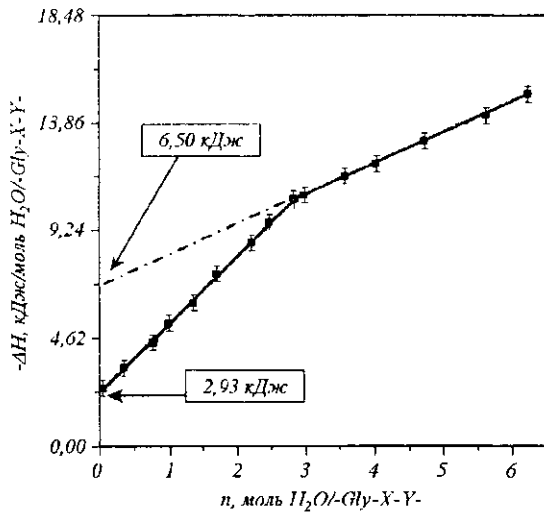


Рис. 6. Зависимости энтальпии плавления коллагена ΔH от степени его гидратации n (n — число молей воды, сорбирующей одним молем трипептида -Gly-X-Y- [26])

максимума полосы Амид I при гидратации $\Delta\nu_{\text{dry} \rightarrow \text{wet}} = -13 \text{ см}^{-1}$ (рис. 4, а), то есть $\Delta H_{\text{dry} \rightarrow \text{wet}} = -2,67 \pm 0,2 \text{ кДж/моль}$. Таким образом, полная энтальпия межпептидной водородной связи $\text{N}_1\text{-H}_1\text{...O}_2=\text{C}_2$ в коллагене равна $\Delta H_{\text{H-pept}} = -5,6 \pm 1,2 \text{ кДж/моль}$.

Полученное значение полной энтальпии межпептидной водородной связи $\text{N}_1\text{-H}_1\text{...O}_2=\text{C}_2$ коллагена может быть несколько заниженным. Это связано с тем, что при денатурации белка в образовавшемся статистическом клубке могут формироваться новые N-H...O=C водородные связи. Такой процесс является экзотермическим и вызывает уменьшение величины энтальпии перехода спираль—клубок, измеряемой калориметрически. Поэтому мы рассматриваем величину $\Delta H_{\text{H-pept}} = -5,6 \pm 1,2 \text{ кДж/моль}$ как нижнюю границу абсолютного значения полной энтальпии межпептидной водородной связи $\text{N}_1\text{-H}_1\text{...O}_2=\text{C}_2$ коллагена.

Для нахождения верхней границы абсолютного значения полной энтальпии межпептидной водородной связи $\text{N}_1\text{-H}_1\text{...O}_2=\text{C}_2$ коллагена значения ΔH кривой $\Delta H(n)$ в каждой точке представим в виде суммы $\Delta H(n) = \Delta H_{\text{H-pept}}(n) + \Delta H_{\text{H-wat}}(n)$, где величины $\Delta H_{\text{H-pept}}(n)$ и $\Delta H_{\text{H-wat}}(n)$ соответствуют энтальпии межпептидной водородной связи $\text{N}_1\text{-H}_1\text{...O}_2=\text{C}_2$ и энтальпии водородных связей пептид—вода. Немонотонное поведение кривой $\Delta H(n)$ объясняется тем, что на начальном этапе процесса гидратации в области $0 \leq n \leq 3$ происходит одновременное образование водородных связей с молекулами

кулами воды внутреннего слоя гидратной оболочки и упрочнение межпептидных водородных связей. В области $n > 3$ значение $\Delta H_{\text{H-pept}}(n) \approx \text{const}$ и рост общей ΔH в основном связан с увеличением числа молекул воды, сорбированных в наружном слое гидратной оболочки.

С учетом вышеизложенного мы определили среднее значение роста общей энтальпии денатурации при увеличении наружного слоя гидратной оболочки коллагена на одну молекулу воды. Оно равно $-1,36 \text{ ккал/моль}$. По данным пьезогравииметрии, средняя энергия гидратации для молекул воды внутреннего слоя превышает таковую для воды наружного слоя гидратной оболочки, следовательно, для интервала $n > 3$ верно следующее соотношение: $\Delta H_{\text{H-pept}} > \Delta H(n) - n \cdot (-1,36) \text{ кДж/моль}$. Подставляя значение $\Delta H(n)$ при любом $n > 3$ можно найти, что верхняя граница абсолютного значения полной энтальпии межпептидной водородной связи $\text{N}_1\text{-H}_1\text{...O}_2=\text{C}_2$ коллагена равна $\Delta H_{\text{H-pept}} < -6,5 \text{ кДж/моль}$.

Таким образом, мы определили верхнюю и нижнюю границы значения полной энтальпии межпептидной водородной связи $\text{N}_1\text{-H}_1\text{...O}_2=\text{C}_2$ коллагена, среднее значение данной энтальпии равно $-6,0 \pm 0,5 \text{ кДж/моль}$. Среднее значение $\Delta H_{\text{H-pept}}$ для $\text{poly}(\text{Gly-Pro-Pro})$ составляет $-7,6 \pm 0,2 \text{ кДж/моль}$.

Полученные нами значения энтальпии межпептидной водородной связи $\text{N}_1\text{-H}_1\text{...O}_2=\text{C}_2$ в коллагеновых структурах хорошо согласуются с величинами экспериментально определенной ранее в работе [36] энергии N-H...O=C водородных связей в белках $\Delta E_{\text{H-pept}} = -6,3 \text{ кДж/моль}$ и энергии водородных связей $\text{N}_1\text{-H}_1\text{...O}_2=\text{C}_2$ в модельном коллагеновом пептиде $(\text{Gly-Pro-Hyp})_8$, недавно полученными методом молекулярной динамики $\Delta E_{\text{H-pept}} = -6,2 \text{ кДж/моль}$ [37].

Для описания физических основ стабилизации биологических макромолекул широко используют определение процентных вкладов энергий различных типов взаимодействия в общую энергию стабилизации молекулы. Классически эти процентные вклады вычисляют на основании уравнения

$$\Delta H_{\text{trans}} = \Delta H_{\text{H-pept}} + \Delta H_{\text{hydr}} + \Delta H_{\text{other}}, \quad (4)$$

где ΔH_{trans} — энтальпия перехода спираль—клубок, определяемая калориметрически; $\Delta H_{\text{H-pept}}$, ΔH_{hydr} , ΔH_{other} — энтальпийные вклады межпептидных водородных связей, водородных связей с водой и взаимодействий других типов (Ван-дер-Ваальсовы

взаимодействия, гидрофобные взаимодействия и др.) [21].

Однако после подстановки в уравнение (4) вычисленных нами значений $\Delta H_{\text{H-pept}}$ и ΔH_{hydr} для коллагена получаем $\Delta H_{\text{trans}} \approx \Delta H_{\text{H-pept}} + \Delta H_{\text{hydr}}$, а для poly(Gly-Pro-Pro) — $\Delta H_{\text{trans}} > \Delta H_{\text{H-pept}} + \Delta H_{\text{hydr}}$. Такое соотношение может быть связано с тем, что уравнение (4) не учитывает экзотермического процесса агрегации денатурированных полипептидных цепей с образованием новых межпептидных водородных связей [38]. Степень агрегации увеличивается с ростом концентрации белка в растворе. Значит, с учетом возможности агрегации уравнение (4) необходимо преобразовать таким образом: $\Delta H_{\text{trans}} = \Delta H_{\text{H-pept}} + \Delta H_{\text{hydr}} + \Delta H_{\text{other}} + \Delta H_{\text{aggr}}$, где ΔH_{aggr} — энтальпия образования агрегатов.

Принимая во внимание, что ΔH_{other} и ΔH_{aggr} в данной работе не вычисляли, мы не рассчитывали процентных вкладов $\Delta H_{\text{H-pept}}$, ΔH_{hydr} и ΔH_{other} , однако было возможным вычислить соотношение вкладов $\Delta H_{\text{H-pept}} : \Delta H_{\text{hydr}}$, составляющее 1:2 для коллагена и 1:1,4 для poly(Gly-Pro-Pro). Эти значения ниже среднего соотношения $\Delta H_{\text{H-bond}} : \Delta H_{\text{hydr}} = 1:2,3$, полученного для разных типов нуклеиновых кислот [21], где $\Delta H_{\text{H-bond}}$ — энтальпия водородных связей в парах азотистых основания АТ и ГС. Это свидетельствует о более существенном вкладе энергии водородных связей между разными цепочками полимера в общую энергию стабилизации тройной коллагеновой спирали по сравнению с двойной спиралью ДНК. Решение вопроса о вкладе энергии других типов взаимодействия требует дальнейших исследований.

Выводы. При гидратации poly(Gly-Pro-Pro) и коллагена в интервале ОВ 0—60 % происходит связывание 3—4 молекул воды внутреннего слоя гидратной оболочки на один фрагмент -Gly-X-Y-. Этот процесс сопровождается конформационным переходом тройной спирали и упрочнением межпептидной водородной связи $N_1-H_1 \dots O_2=C_2$. Энергии гидратации poly(Gly-Pro-Pro) и коллагена составляют -10,9 и -12,2 кДж/моль соответственно. Энтальпии межпептидной водородной связи $N_1-H_1 \dots O_2=C_2$ для poly(Gly-Pro-Pro) и коллагена равны $-7,6 \pm 0,2$ и $-6,0 \pm 0,5$ кДж/моль соответственно. Соотношения вкладов $\Delta H_{\text{H-pept}} : \Delta H_{\text{hydr}}$ у коллагена отвечает 1:2, у poly(Gly-Pro-Pro) — 1:1,4.

Авторы выражают искреннюю благодарность проф. Е. Э. Перскому (ХНУ) за интерес к работе и обсуждение результатов.

O. P. Boryskina, T. V. Bolbukh, M. A. Semenov, V. Ya. Maleev

Physical factors of collagen triple helix stability

Summary

In the present study a complex approach of a number of experimental techniques, namely infrared spectroscopy, quartz piezogravimetry, and differential scanning calorimetry, was used to estimate the hydration energy and enthalpy of interpeptide hydrogen bonds. On the basis of the results obtained the values of relative contributions of energies of interactions of different types into the total energy of stabilization of triple helical collagen structures were evaluated.

Keywords: collagen, poly(Gly-Pro-Pro), hydration energy, enthalpy of hydrogen bonds, infrared spectroscopy.

O. П. Борискина, Т. В. Большух, М. О. Семенов, В. Я. Малеев

Фізичні фактори стабільності трьохспіральної структури колагенового типу

Резюме

Розраховано ентальпії міжпептидних водневих зв'язків та енергію гідратації модельного колагенового політрипептиду poly(Gly-Pro-Pro) та колагену, а також оцінено відносні внески енергій різних типів взаємодій у загальну енергію стабілізації трьохспіральної структури колагенового типу. Розрахунок здійснено на основі даних комплексу експериментальних фізичних методик: ІЧ спектроскопії, пьезогравіметрії та диференційної сканувальної калориметрії.

Ключові слова: колаген, poly(Gly-Pro-Pro), енергія гідратації, ентальпія водневих зв'язків, ІЧ спектроскопія.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Ramshaw J. A. M., Shah N. K., Brodsky B. Gly-X-Y tripeptide frequencies in collagen: a context for host-guest triple-helical peptides // Struct Biol.—1998.—122.—P. 86—91.
- Никитин В. Н., Перский Е. Э., Утевская Л. А. Возрастная и эволюционная биохимия коллагеновых структур.—К.: Наукова думка, 1977.—279 с.
- Kramer R. Z., Bella J., Mayville P., Brodsky B., Berman H. M. Sequence dependent conformational variations of collagen triple-helical structure // Nat. Struct. Biol.—1999.—6.—P. 454—457.
- Emsley J., Knight C. G., Farndale R. W., Barnes M. J., Liddington R. C. Structural basis of collagen recognition by integrin $\alpha_2\beta_1$ // Cell.—2000.—100.—P. 47—56.
- Berisio R., Vitagliano L., Mazzarella L., Zagari A. Crystal structure of the collagen triple helix model [(PRO-PRO-GLY)10]₃ // Protein Sci.—2002.—11.—P. 262—270.
- Berisio R., Vitagliano L., Mazzarella L., Zagari A. Crystal structure of a collagen-like polypeptide with repeating sequence Pro-Hyp-Gly at 1.4 Å resolution: implications for collagen hydration // Biopolymers.—2001.—56.—P. 8—13.
- Rainey J. K., Goh M. C. A statistically derived parameterization for the collagen triple-helix // Protein Sci.—2002.—11.—P. 2748—2754.
- Pinery M. H., Escoubes M., Roche G. Water-collagen interactions: calorimetric and mechanical experiments // Biopolymers.—1978.—17.—P. 2799—2815.
- Eisenmenger F., Eisenhaber F., Tumanyan V. G., Esipova N. G. Monte Carlo simulation of the water environment of collagen // Stud. Biophys.—1983.—98.—P. 155—160.

10. Lazarev Y. A., Grishkovsky B. A., Khromova T. B., Lazareva A. V., Grechishko V. S. Bound water in the collagen-like triple-helical structure // *Biopolymers*.—1992.—32.—P. 189—195.
11. Privalov P. L. Stability of proteins. Proteins which do not present a single cooperative system // *Adv. Protein Chem.*—1982.—35.—P. 1—104.
12. Engel J., Chen H.-T., Prockop D. J. The triple helix-coil conversion of collagen-like polytripeptides in aqueous and nonaqueous solvents. Comparison of the thermodynamic parameters and the binding of water to (L-Pro-L-Pro-Gly)_n and (L-Pro-L-Hyp-Gly)_n // *Biopolymers*.—1977.—16.—P. 601—622.
13. Holmgren K., Taylor K. M., Bretscher L. E., Raines R. T. Code for collagen's stability deciphered // *Nature*.—1998.—392.—P. 666—667.
14. Jenkins C. L., Raines R. T. Insights on the conformational stability of collagen // *Nat. Prod. Rep.*—2002.—19.—P. 49—59.
15. Tumanyan V. G., Esipova N. G. Comprehensive conformational analysis of (Gly-Pro-Pro)_n and (Gly-Pro-Hyp)_n related to collagen // *Biopolymers*.—1982.—21.—P. 475—497.
16. Lazarev Y. A., Lobachov V. M., Grishkovski B. A., Shibnev V. A., Grechishko V. S., Finogenova M. P., Esipova N. G., Rogulenkova V. N. Formation of the collagen-like triple-helical structure in oligopeptides during elongation of the molecular chain // *Biopolymers*.—1978.—17.—P. 1215—1233.
17. Bella J., Eaton M., Brodsky B., Berman H. M. Crystal and molecular structure of a collagen-like peptide at 1.9 Å resolution // *Science*.—1994.—266.—P. 75—81.
18. Miles C. A., Grelashvili M. Polymer-in a-Box mechanism for the thermal stabilization of collagen molecules in fibers // *Biophys. J.*—1999.—76.—P. 3243—3252.
19. Traub W., Yonath A. Polymers of tripeptides as collagen models. I. X-ray studies of poly (Pro-Gly-Pro) and related polypeptides // *J. Mol. Biol.*—1966.—16.—P. 404—414.
20. Semenov M. A., Bolbukh T. B., Maleev V. Y. Infrared study of the influence of water on DNA stability in the dependence on AT/GC composition // *J. Mol. Struct.*—1997.—4008/4009.—P. 213—217.
21. Semenov M. A., Bereznyak E. G. Hydration and stability of nucleic acids in the condensed state // *Comments Mol. Cell. Biophys.*—2000.—10.—P. 1—23.
22. Chandrakasan G., Torchia D. A., Piez K. A. Preparation of intact monomeric collagen from rat tail tendon and skin and the structure of the nonhelical ends in solution // *J. Biol. Chem.*—1976.—251.—P. 6062—6067.
23. Wexler A., Hasegawa S. Relative humidity-temperature relationships of some saturated salt solutions in the temperature range 0 °C to 50 °C // *J. Res. Nat. Bur. Stand.*—1954.—53.—P. 19—26.
24. Lazarev Yu. A., Chishkovsky B. A., Chromova T. B. Amide I band of IR spectrum and structure of collagen and related polypeptides // *Biopolymers*.—1985.—24.—P. 1449—1478.
25. Semenov M. A., Starikov E. B., Bolbukh T. V. Hydration isotherms and structural state of nucleotides and polynucleotides // *Stud. biophys.*—1988.—123.—P. 217—224.
26. Gasan A. I., Maleev V. Ya., Semenov M. A. Role of water in stabilizing the helical biomacromolecules DNA and collagen // *Stud. biophys.*—1990.—136.—P. 171—178.
27. Falk M., Hartman K. A., Lord R. C. Hydration of DNA: gravimetric study // *J. Amer. Chem. Soc.*—1962.—4.—P. 3843—3846.
28. Buck M., Karplus M. Hydrogen bond energetics: A simulation and statistical analysis of N-methyl acetamide (NMA), water, and human lysozyme // *J. Phys. Chem.*—2001.—105.—P. 11000—11015.
29. Miyazawa T., Blout E. R. The Infrared spectra of polypeptides in various conformations: Amide I and II bands // *J. Amer. Chem. Soc.*—1961.—83.—P. 712—719.
30. Чиргадзе Ю. Н. Инфракрасные спектры и структура полипептидов и белков.—М.: Наука, 1965.—135 с.
31. Traub W., Yonath A. Polymers of tripeptides as collagen models. I. X-ray studies of poly (L-prolyl-glycyl-L-proline) and related polytripeptides // *J. Mol. Biol.*—1966.—16.—P. 404—414.
32. Gordon P. L., Huang C., Lord R. C., Yannas I. L. The Far-Infrared spectrum of collagen // *Macromolecules*.—1974.—7.—P. 954—956.
33. Мележик Е. П., Семенов М. А. Резонансные взаимодействия карбонильных колебаний в коллагеновых структурах // *Біофіз. вісн.*—2003.—606, № 13.—С. 62—68.
34. Мележик Е. П., Семенов М. А., Иванов А. Ю. Исследование тонкой структуры полосы Амид I ИК-Фурье спектра коллагена // *Біофіз. вісн.*—2005.—665, № 15.—С. 62—67.
35. Семенов М. А. Гидратация и структурное состояние нуклеиновых кислот в конденсированном состоянии: дис. ... д-ра физ.-мат. наук.—М.: МГУ, 1990.
36. Schellman J. A. The stability of hydrogen-bonded peptide structures in aqueous solution // *C. r. Trav. Lab. Carlsberg Ser. Chim.*—1955.—29.—P. 230—259.
37. Radmer R. J., Klein T. E. Triple-helical structure and stabilization of collagen-like molecules with 4(R)-hydroxyproline in the Xaa position // *Biophys. J.*—2006.—90.—P. 578—588.
38. Maleev V. Ya., Gasan A. I. A statistical mechanical study of helix-coil transition in concentrated solutions of polypeptides and proteins // *Biopolymers*.—1974.—13.—P. 2409—2422.

УДК 577.322

Надійшла до редакції 03.04.06