

Физические свойства и структура связанной воды в фибриллярных белках коллагенового типа по данным сканирующей калориметрии

С. П. Габуда^{*1)}, А. А. Гайдаш^{*+}, В. А. Дребушак^{*□}, С. Г. Козлова^{*}

^{*} Институт неорганической химии им. А. В. Николаева Сибирского отделения РАН, 630090 Новосибирск, Россия

⁺ Институт клинической и экспериментальной медицины Сибирского отделения РАМН, 630117 Новосибирск, Россия

[□] Институт минералогии и петрографии Сибирского отделения, 630090 Новосибирск, Россия

Поступила в редакцию 5 сентября 2005 г.

После переработки 4 октября 2005 г.

Калориметрическим методом исследован фазовый переход первого рода, наблюдающийся для половины (~50%) связанной воды в коллагене сухожилия хвоста крысы. Показано, что величина скрытой теплоты перехода, температура перехода и теплоемкость высокотемпературной фазы данной подсистемы близки к характеристикам свободной воды. Свойства другой половины связанной воды (~50%) в коллагене близки к свойствам цеолитной воды.

PACS: 87.15.Бу, 87.19.Рр

Фибриллярный белок коллаген составляет примерно треть всех полипептидов в организме животных и человека [1]. В сухожилиях содержание коллагена достигает 94%, в коже – до 75%, в костной ткани – около 50%. Одной из фундаментальных особенностей коллагена является то, что в его составе содержится большое количество воды, составляющей около 66% массы в нативном (неповрежденном) состоянии. Установлено, что вода играет существенную роль в механизме самосборки молекул коллагена и образования фибрилл в цитоплазме коллагеноцитов, а также в механизмах биохимической активности и функционировании коллагена во внеклеточном пространстве живого организма [1]. Однако до настоящего времени принципиальный характер гидратной структуры коллагена остается невыясненным.

Коллаген характеризуется высокой степенью молекулярной упорядоченности и кристалличности. По данным рентгенодифракционного исследования с использованием пучка синхронного излучения [2,3], идеализированная структура коллагена относится к пространственной группе $P1$ (триклинный) с параметрами решетки $a = 39.97 \text{ \AA}$; $b = 26.95 \text{ \AA}$; $c = 677.9 \text{ \AA}$; $\alpha = 89.24^\circ$; $\beta = 94.59^\circ$; $\gamma = 105.58^\circ$. Основной структурной единицей коллагена являются стержнеобразные макромолекулы в форме тройной спирали из трех неидентичных цепочек по ~1040 аминокислотных остатков каждая; молекулярная масса такой макромолекулы (так называемого тропоколлагена) составляет ~ 300 000, ее длина ~ 2800 \AA ,

диаметр ~ 14 \AA . В кристаллической структуре коллагена макромолекулы укладываются параллельно оси c структуры; в ab - проекции элементарной ячейки содержится 5 их сечений (рис.1, слева), причем моле-

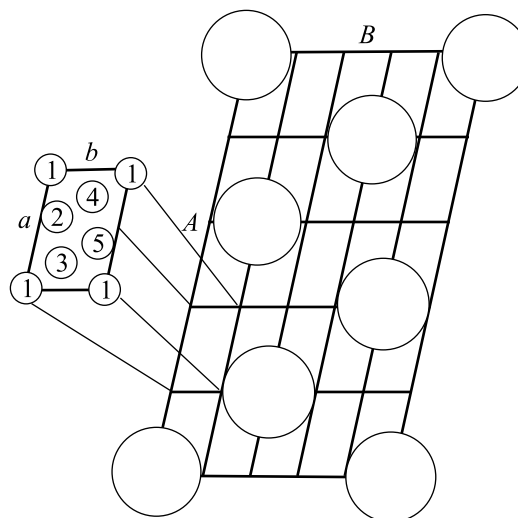


Рис.1. Расположение макромолекул тропоколлагена в продольной (вдоль оси c) проекции. Слева: ab – проекция элементарной ячейки в плотных участках структуры коллагена, цифры от 1 до 5 указывают положения сечений структурно неэквивалентных макромолекул. Справа: AB – проекция элементарной ячейки в рыхлых участках структуры коллагена; большие круги указывают расположение “цистерн”, каждая из которых образуется за счет объединения продольных промежутков между макромолекулами из 4-х соседних субъединиц

¹⁾e-mail: gabuda@che.nsk.su

кулы H_2O располагаются в тесном пространстве между боковыми группировками макромолекул.

Другой структурный тип локализации H_2O в коллагене относится к более свободному пространству между концевыми C - и N -группировками макромолекул. Существенно, что в продольном направлении (c) следующие друг за другом макромолекулы не соприкасаются своими концевыми C - и N -группировками, а величина промежутков, или “щелей”, составляет около $350\text{--}370\text{ \AA}$. Распределение подобных “вакансий” в структуре коллагена является строго упорядоченным как в плоскостях AB , где $A = 5a$ и $B = 5b$ (правая часть рис.1), так и в направлении оси c , что проявляется в форме характерной поперечной исчерченности коллагена с периодом $c_0 = 640\text{--}700\text{ \AA}$, видимой на электронномикроскопических снимках (рис.2 [4–6]). Надмолекулярная

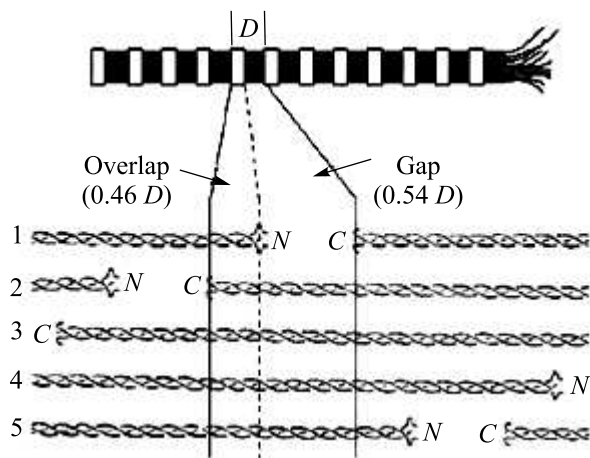


Рис.2. Схема продольной укладки макромолекул тропоколлагена и формирования поперечной исчерченности. Период поперечной исчерченности D волокон фактически равен c_0 . Цифры от 1 до 5 соответствуют обозначениям рис.1

кулярное строение, проявляющееся в подобной поперечной исчерченности волокон, является характерным признаком всех известных (не менее 19 типов [1]) белков группы коллагена, различающихся особенностями первичной структуры. Следствием упорядоченного расположения вакансий является наличие в структуре коллагена своеобразных “наночистерн” сечением $\sim 30\text{--}35\text{ \AA}$ и длиной $350\text{--}370\text{ \AA}$, свободных от коллагеновых макромолекул, но включающих накопиллярную воду.

Для выяснения принципиального характера гидратной структуры коллагена были исследованы образцы сухожилий хвоста крысы (RTT). Распределение воды в образцах было исследовано методом

2H ЯМР. Образцы весом $100\text{--}150\text{ мг}$ изымали непосредственно перед исследованием и для обогащения изотопом 2H погружали в 99%-ную тяжеловодородную воду (на 20 мин). Спектры 2H ЯМР (рис.3) представляют собой суперпозицию полос двух ти-

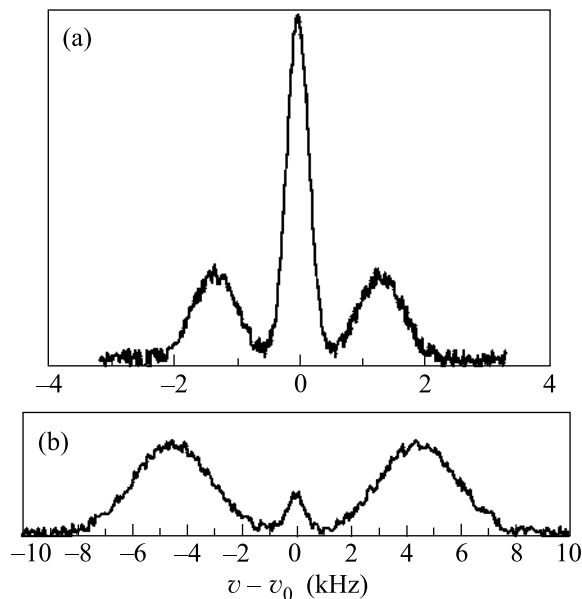


Рис.3. Спектр 2H ЯМР одиночного волокна РТТ, ориентированного перпендикулярно магнитному полю спектрометра. Условия записи: спектрометр Bruker СХР-300; ларморовская частота $\nu_0 = 46\text{ МГц}$, регистрация спектра после одного импульса. Расстояние между компонентами дублета $\Delta\nu = 3/4C_{qcc}$, где C_{qcc} – эффективная константа квадрупольной связи ядер 2H . (а) – комнатная температура; (б) – температура -10°C

пов – дублета, характерного для разупорядоченных квазижидкокристаллических систем [7], и центральной линии, характерной для жидкой фазы воды; соотношение двух типов составляет $\sim 1:1$. К первому типу можно отнести подсистему молекул воды в пространстве между боковыми группировками макромолекул, тогда как центральную линию – к водной подсистеме “цистерн” из областей “щелей”. В пользу данного заключения указывает факт скачкообразного исчезновения центральной линии при понижении температуры ниже -10°C , что может быть связано с образованием фазы “нанольда в наночистернах”. Данный факт косвенно свидетельствует в пользу модели, в соответствии с которой “рыхлые” участки структуры коллагена представляют собой тектогидрат, или структуру, включающую непрерывный трехмерный каркас из молекул воды с тетраэдрической координацией, характерной для льда и клатратных гидратов. Прямое подтверждение подобной мо-

дели расположения молекул воды в широкопористой структуре коллагена в области “щелей” может быть получено из анализа величины скрытой теплоты фазового перехода в сухожилиях хвоста крысы РТТ, обнаруживаемого не только по спектроскопическим данным ^2H ЯМР [8], но и по данным сканирующей калориметрии.

Исследование было проведено на образцах сухожилий с использованием автоматического калориметра ДСК-204 Netzsch, Германия. Измерения проводили в интервале от комнатной температуры ($+20\text{ }^\circ\text{C}$) до $-30\text{ }^\circ\text{C}$, скорость изменения температуры $-3^\circ/\text{мин}$. Типичная кривая охлаждения-нагрева представлена на рис.4. На экспериментальных кривых на-

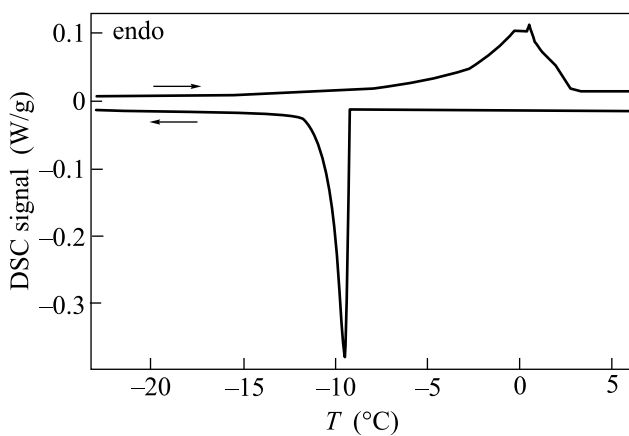


Рис.4. Типичная кривая дифференциальной сканирующей калориметрии сухожилий хвоста крысы (РТТ) линии “Вистар”. Количество экспериментальных животных в группе – 3; Возраст – 6 мес; навеска изымаемого образца сухожилия – 40 мг, скорость изменения температуры $-3^\circ/\text{мин}$. Нижняя кривая – охлаждение, верхняя кривая – нагрев

блюдается переохлаждение с температурой замерзания $T_{\text{зам}} = -9.2 \pm 0.5\text{ }^\circ\text{C}$ и скрытая теплота кристаллизации $Q_{\text{зам}} = -73.3 \pm 1.9\text{ Дж/г}$; для кривых нагрева максимальное значение температуры плавления составило $T_{\text{пл}} = +2.3 \pm 0.2\text{ }^\circ\text{C}$ и скрытая теплота плавления $Q_{\text{пл}} = 89.15 \pm 2.0\text{ Дж/г}$. Полученные данные можно сравнивать со справочными параметрами для скрытой теплоты плавления чистого льда: $Q_{\text{пл(лед)}} = 333.5\text{ Дж/г}$ [9]. При сравнении следует учитывать, что в сухожилиях содержание коллагена достигает 94%, общее содержание воды в нативном коллагене составляет около $\sim 60\%$, в том числе в нанокapиллярах – $\sim 30\%$. Таким образом, если структура подсистемы молекул воды в вакансионных участках структуры коллагена при отрицательных температурах соответствует структу-

ре тектогидрата (клатратоподобного или льдоподобного типа), то ожидаемая скрытая теплота фазового перехода в данной подсистеме должна составить $Q_{\text{пл(РТТ)}} \sim (0.3 \cdot 0.94)$, $Q_{\text{пл(лед)}} \sim 94\text{ Дж/г}$, что находится в хорошем согласии с измеренными значениями для трех образцов.

На кривых охлаждения наблюдаются пониженные значения $Q_{\text{зам}}$, что является следствием значительного переохлаждения образцов при понижении температуры. Данный эффект позволяет получить оценочное значение теплоемкости c_p высокотемпературной фазы подсистемы молекул воды, испытывающей фазовый переход. В рамках обсуждаемой модели среднее значение величины изменения теплоты фазового перехода $\Delta Q_{\text{пер}} = 16.55 \pm 3.9\text{ Дж/г}$ должно быть связано со средней величиной температуры переохлаждения $\Delta T = (11.5 \pm 0.7)^\circ$ соотношением $\Delta Q_{\text{пер(РТТ)}} \sim (0.3 \cdot 0.94) \cdot \Delta c_p \Delta T$, где Δc_p – разность между теплоемкостями воды и льда. Если свойства водной подсистемы, испытывающей фазовый переход в коллагене, соответствуют свойствам свободной воды и льда, то $\Delta c_p = 2.062\text{ Дж/г} \cdot \text{K}$ (вблизи 0°C [9]). Отсюда рассчитанная величина $\Delta Q_{\text{пер(РТТ)}} \sim 6.69\text{ Дж/моль}$; пониженное по сравнению с экспериментом значение расчетной величины $\Delta Q_{\text{пер}}$ может указывать на существование вклада в Δc_p , связанного с взаимодействием молекул воды и функциональных группировок в цистернах, таких, например, как телопептиды, достоверно обнаруживаемые в окрестности щелей [2]. Аналогичный вывод следует также из некоторого повышения температуры плавления льда в коллагене по сравнению со свободным льдом (рис.4). Таким образом, на качественном уровне величина скрытой теплоты фазового перехода находится в согласии с моделью, согласно которой свойства нанокapиллярной воды в структуре коллагена близки к свойствам свободной (или объемной) воды. Повышенные температура плавления льда связанной воды в коллагене и разница теплоемкостей Δc_p могут указывать на некоторую взаимосогласованность структуры воды и функциональных групп, возможно, клатратного типа.

В заключение отметим, что при понижении температуры, согласно данным ^2H ЯМР, в “плотных” участках структуры коллагена также наблюдается процесс уменьшения степени разупорядоченности и диффузионной подвижности молекул воды. Однако наблюдаемые плавные изменения дублетного расщепления в широком интервале температур до -20 до $-30\text{ }^\circ\text{C}$ более характерны для нанопористых систем типа цеолитов и глинистых минералов. Фазовые переходы в подобных системах, как правило, являют-

ся переходами типа порядок – беспорядок (близкими к фазовым переходам второго рода). Согласно полученным нами данным дифференциальной сканирующей калориметрии, в коллагене RTT нет тепловых эффектов, связанных с упорядочением в подсистеме “плотных” участков. Можно предполагать, что упорядочение молекул воды в плотных участках сопровождается фазовым переходом второго рода.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект # 05-03-32263) и при частичной поддержке гранта BRNE CRDF # 0-008-XI.

1. *Collagen I-4*, Ed. M. E. Nimni, CRS Press: Boca Raton, FL, 1988.

2. J. P. Orgel, A. Miller, T. C. Irving et al., *Structure* **9**, 1061 (2001).
3. J. P. Orgel, A. Miller, T. C. Irving, and T. J. Wess, *Fibre diffraction Rev.* **10**, 40 (2002).
4. T. J. Wess, A. P. Hammersley, L. Wess, and A. Miller, *Journ. Mol. Biol.* **248**, 485 (1995).
5. D. J. S. Holmes, T. J. Wess, D. J. Prockop, and P. Fratzl, *Biophys. Journ.* **68**, 1661 (1995).
6. R. B. D. Frazer and B. L. Trus, *Biosci. Rep.* **6**, 221 (1986).
7. D. Freude, in *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, Ed. R. A. Meyers, Wiley, Chichester, 2000, p. 12188.
8. С. П. Габуда, А. А. Гайдаш, Е. А. Вязовая, *Биофизика* **50**, № 2, 231 (2005).
9. *Термодинамические свойства индивидуальных веществ*, Справочн. изд., отв. ред. В. П. Глушко, том 1, кн. 2, М.: Наука, 1978.