

на правах рукописи

УДК 577.322.9

РУБИН МАКСИМ АНДРЕЕВИЧ

Влияние пролина на конформационную
стабильность полипептидных цепей коллагенов

03.00.02. – биофизика

автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук

Москва 2008

Работа выполнена в Учреждении Российской академии наук
Институте молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН

Научные руководители:

кандидат физико-математических наук,

Есипова Наталия Георгиевна

доктор биологических наук, академик

Макаров Александр Александрович

Официальные оппоненты:

доктор физико-математических наук, профессор

Лобышев Валентин Иванович

доктор физико-математических наук

Нечипуренко Юрий Дмитриевич

Ведущая организация:

Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, г.

Пушино.

Защита состоится 19 февраля 2009 г. в _____ час. _____ мин. на заседании диссертационного совета Д 501.001.96 при Московском государственном университете им. М.В. Ломоносова, Москва (Россия 119991, Москва, Ленинские горы 1, корп. 12, МГУ, Биологический факультет, кафедра биофизики).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова.

Автореферат разослан «_____» января 2009 г.

Ученый секретарь диссертационного Совета

доктор биологических наук, профессор

Кренделёва Т.Е.

Общая характеристика работы

Введение. Актуальность проблемы.

Коллаген считается самым распространенным белком. Его содержание в тканях животных превышает 60%. Долгое время полагали, что фибриллярный коллаген ответственен лишь за опорные и предохранительные функции. Однако, установление коллагеновых участков в Cq1-компоненте комплемента, в ацетилхолинэстеразе и, наконец, открытие различных типов коллагена показало, что для коллагенового семейства характерно большое функциональное разнообразие. Но что делает коллагены уникальными белковыми объектами, так это разнообразие тех уровней организации, на которых происходит реальное функционирование коллагеновых полипептидов.

Общепринято, что физико-химические свойства макромолекул определяются последовательностью их химических единиц. Понимание молекулярных основ функционирования макромолекул предполагает знание системы взаимодействий, приводящих к формированию различных уровней организации. А это, в свою очередь, предполагает детализацию роли каждого из элементов структуры в определении физических свойств макромолекул.

Вместе с тем в наших знаниях практически о любом из уровней организации структуры имеются существенные пробелы. Например, количественному изучению до сих пор поддаются лишь две из трех регулярных вторичных структур: α -спираль и β -структура. Важнейший, как ясно сегодня, третий тип структуры – левая спираль типа поли-l-пролин II – а это основа структурообразования коллагенов – до сих пор недостаточно охарактеризован количественно, прежде всего, в смысле физических характеристик,

где наибольшую неясность вносит боковой радикал пролина, ответственный за само название типа структуры. Действительно, гидрофобный боковой радикал пролина – пятичленное пирролидиновое кольцо – не снижает высокую растворимость как пролина, так и пептидов с пролином и поли-*l*-пролина. Растворимость указанных пептидов значительно выше, чем это ожидалось в соответствии с индексом гидрофобности бокового радикала. Эти свойства пролиновых пептидов, несомненно, определили необычные явления, наблюдаемые при денатурации (плавлении) фибриллярных макромолекул коллагенов. С ростом содержания иминокислот растет энтропия денатурационного перехода, что не соответствует ограничениям числа конформационных состояний пролина – пятичленного кольца, замыкающегося C^αN-связью в основной цепи полипептида. Вместе с тем именно структуры коллагенового типа являются основой многих новых материалов для промышленности и медицины.

Приведенные доводы делают очевидной большую актуальность исследований левой спирали типа поли-*l*-пролин II и пролина как регулятора процессов структурообразования коллагенов и других белков, а также структуры и физических свойств материалов, сконструированных на основе фибриллярных коллагеновых систем.

Цель и задачи исследования.

Главной целью проведённой работы было установление молекулярных механизмов влияния иминокислот, пролина и оксипролина, на термодинамические характеристики коллагенов и одноцепочечных полипептидных систем в конформации левой спирали типа поли-*l*-пролин II.

В задачи работы входило:

- анализ термодинамических характеристик коллагенов из различных источников и с различным содержанием иминокислот;
- расчет параметров переходов, включая оценку размеров кооперативных областей на основании сравнения калориметрической и Вант-гоффовской энтальпий;
- сравнительный анализ архитектуры гидратации трехспиральных макромолекул коллагенов и аминок- и иминокислот;
- сравнительный анализ характеристик сеток водородных связей в коллагенах по совокупности данных термодинамического, спектрального анализа и анализа возможных типов гидратации структур;
- поиск вытянутых левоспиральных конформаций в линкерных пептидах белков, установление роли линкерных пептидов в комплексах двуспиральная ДНК-белок.

Научная новизна.

Впервые установлен молекулярный механизм влияния иминокислот на физические характеристики коллагенов. Показано, что дегидратация пептидных групп в местах расположения пролинов приводит к разделению кооперативных областей на несвязанные части. Далее в несвязанных частях бывшей кооперативной области варьируют параметры NH-валентных колебаний, что выражается в уширении соответствующих полос в ИК-спектрах денатурированных коллагенов. Последующий разрыв H-связей, казалось, позволил бы произойти гидратации пептидных групп. Однако это не совместимо с кооперативной гидратацией олигопептидов, содержащих аминокислоты. Как следствие, на участках, где одиночная цепь имеет

разрывы в кооперативной сетке Н-связей воды, а азот иминокислоты дегидратирован, увеличивается конформационная подвижность иминогруппы. Таким образом, увеличение числа дефектов в кооперативной сетке водородных связей воды вокруг одиночных (после денатурации трехцепной макромолекулы коллагенов) цепочек приводит к росту энтропии перехода по мере роста содержания иминокислот в коллагенах.

Впервые для интерпретации результатов термодинамических данных по плавлению коллагенов проведен систематический расчет числа кооперативных областей в фибриллярной макромолекуле.

Впервые показано, что характер гидратации одиночной левой спирали типа поли-*l*-пролин II зависит от последовательности расположения остатков пролина в полипептидной цепи.

Анализ линкерных пептидов показал, что левая спираль типа поли-*l*-пролин II часто возникает на линкерных участках белков. При образовании контактов этими участками полипептидных цепей левая спираль на них часто сохраняется, при этом средняя длина участков поли-*l*-пролин II составляет шесть остатков, что означает некооперативность гидратации пептидных групп, то есть поверхность узнавания таких мест определяется скорее боковыми радикалами, чем профилем поверхности кооперативной сетки воды.

Установлены участки контактов ДНК и пептидов в конформации левой спирали типа поли-*l*-пролин II.

Практическое значение работы.

Результаты данной работы могут представлять ценность при создании системы предсказания участков взаимодействия полипептидных цепей в коллагенах разного типа и разного происхождения. Тонкая регуляция таких контактов осуществляется

за счет специфики структур гидратной воды в разных последовательностях аминок- и иминокислот.

Установление роли иминокислот в коллагенах допускает возможность на новой основе прогнозировать следствия мутационных замен в генах коллагенов, что позволит уже в ближайшее время начать разработку соответствующих терапевтических подходов.

Полученные новые знания о термодинамике коллагенов дадут возможность проектировать коллагеновые материалы с заданной температурной стабильностью и адгезионными свойствами.

Апробация работы и публикации.

По материалам диссертации опубликовано три печатные работы, в том числе две статьи в реферируемых журналах из списка ВАК и одна в тезисах III съезда биофизиков России.

Объём и структура диссертации.

Диссертация изложена на 101 странице, иллюстрирована 35 рисунками и содержит 14 таблиц, список литературы включает 131 ссылку. Диссертация состоит из введения, пяти глав, включая обзор литературы, выводов, списка цитированной литературы.

Краткое содержание работы.

Введение

Введение содержит обоснование актуальности темы диссертации, ее научной новизны и практической значимости, приведены положения, выносимые на защиту.

Глава 1. Обзор литературы.

В обзоре литературы рассматриваются: общие характеристики структур коллагенового типа, обсуждаются возможности классификации этих макромолекул в ряду хорошо охарактеризованных типов белковых структур. Значительное внимание уделяется описанию и анализу пространственных структур коллагенов, рассматривается влияние иминокислот, точнее пирролидиновых колец пролина и оксипролина, на стереохимию этих структур. Выделяются содержащиеся в литературе данные, требующие биоинформатического анализа. Коллагены – основные белки предохранительных, опорных и соединительных тканей в организмах животных встречаются так же во всем таксономическом ряду организмов от одноклеточных, например, бактерий до организмов беспозвоночных и позвоночных животных, аналоги коллагенов замечены в царстве растений. В структурном отношении это большой класс белков, включающих значительную фибриллярную часть, сформированную тройными спиралями, образованными специфическими периодическими последовательностями аминокислот, типа $(\text{Gly-X-Y})_n$, где Gly – глицин, а X и Y любой остаток амино- или иминокислоты, причем содержание последних достигает 15-20% процентов. В последнее время круг уровней организации, на которых фибриллярные структуры коллагенового типа оказываются функционально значимыми, резко расширился. Стало очевидным, что функциональная роль поверхностей тройных спиралей коллагенового типа разнообразна и простирается от уровня макромолекул, через уровень клеток на уровень тканей. Так же ясно, что не только надмолекулярный уровень организации тройной спирали

коллагенового типа (см. Рис.1) важен для функционирования, но поверхность одиночной тройной спирали оказалась активной в аспекте ряда функций.

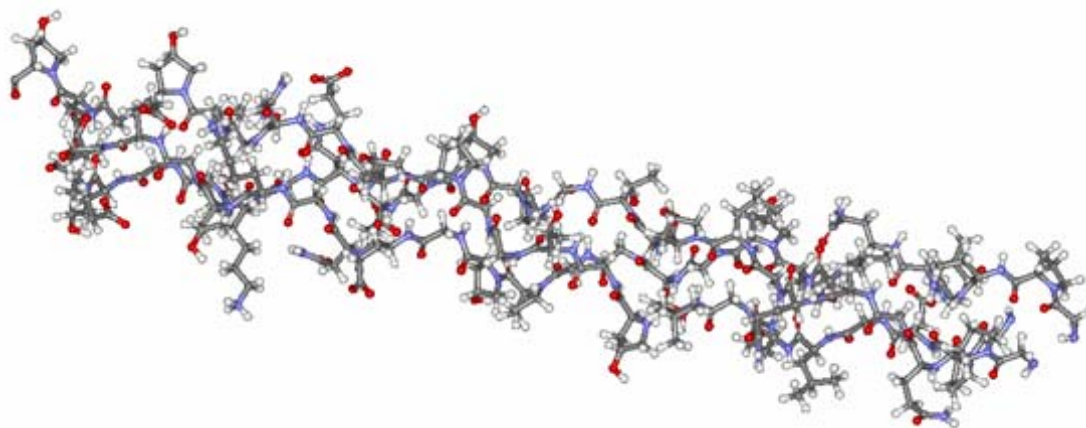


Рис.1. Тройная спираль коллагенового типа.

Поэтому представляется важным анализ возможных конформационных состояний пространственной структуры трехспиральной молекулы коллагена. Это существенно для понимания возможностей регуляции термодинамических и других физико-химических характеристик фибриллярных макромолекул. В самом деле, совершенно не обязательно, чтобы те усредненные структурные параметры спирали, которые мы определяем по рентгенограммам коллагеновых фибрилл, генерировались в целой одиночной тройной спирали. Поэтому анализ структур одиночных макромолекул коллагенов до сих пор представляет существенный интерес не только для понимания структурных основ функционирования рецепторных элементов пространственной структуры и построения моделей «созревания» коллагеновых фибрилл, но также и для понимания особенностей регуляторного влияния пирролидиновых колец на температурную и механическую стабильность фибриллярных структур.

Как распределение пролина в последовательности аминокислот полипептидной цепи сказывается на способности макромолекул коллагенов к взаимодействию с водой и другими макромолекулами – вопрос по-прежнему важный, однако он до сих пор не решен.

В обзоре литературы рассматриваются способы гидратации макромолекул коллагенов и одиночных левых спиралей типа поли-*l*-пролин II. Делается вывод, что вариации структуры вдоль оси волокна у коллагеновой макромолекулы, связанные с пирролидиновыми кольцами, требуют нового анализа, прежде всего термодинамических характеристик отдельной макромолекулы. Отмечается дефицит данных по стереохимии одиночных левых спиралей типа поли-*l*-пролин II и возможным механизмам адсорбции на белках и нуклеиновых кислотах с образованием тройных белково-нуклеиновых спиралей.

Глава 2. Методы.

В первой части главы содержится описание методов термодинамического анализа кривых поглощения тепла макромолекулами коллагенов. Использовались кривые поглощения тепла макромолекулами проколлагенов, выделенных из кожи пяти различных коллагенов пойкилотермных и гомойотермных животных. Впервые обращается особое внимание на проблему выявления числа кооперативных единиц, проявляющихся в кривых плавления в виде неравенства калориметрической и Вант-гоффовской энтальпий. Предполагалось, что установление зависимости между числом кооперативных единиц и содержанием аминокислот в макромолекулах соответствующих коллагенов должно показать, как пролин влияет на строение кооперативных областей в макромолекуле. В качестве показателей состояния водородных

связей в макромолекулах с различным содержанием иминокислот использовались инфракрасные спектры коллагенов. На простейшей модели одномерной решетки, образуемой длинной линейной молекулой, на которой имеются какие-либо молекулярные группы, расположенные на одинаковом расстоянии друг от друга, продемонстрирован эффект неоднородного уширения в колебательных спектрах и установлена его связь с содержанием пирролидиновых колец.

Во второй части главы приводится описание использованных подходов к анализу влияния пролина на свойства одиночных левых спиралей типа поли-l-пролин II в аспекте возможной роли одиночных левых спиралей типа поли-l-пролин II в процессах образования комплексов с ДНК.

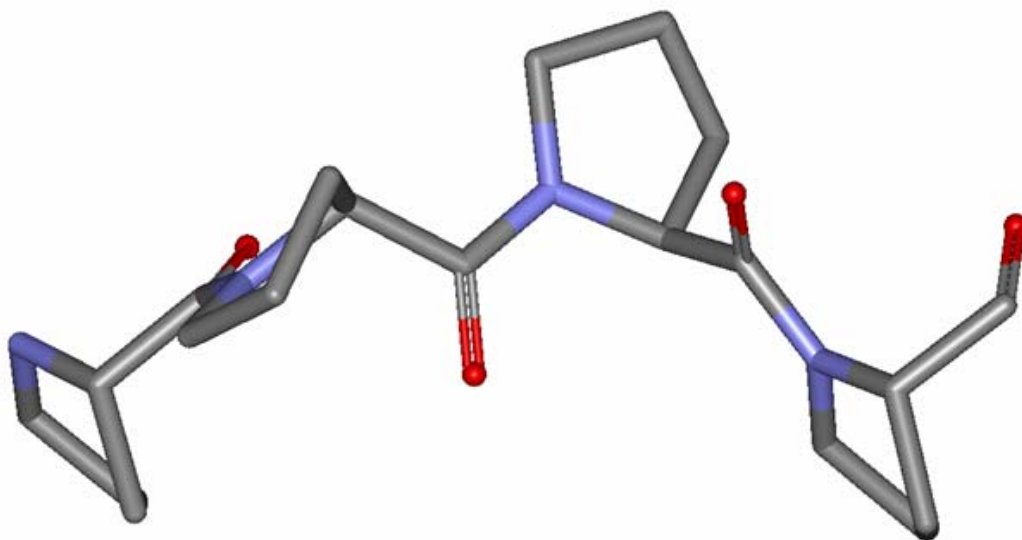


Рисунок 2. Тетрапептид пролина. Псевдо ось симметрии второго порядка проходит перпендикулярно оси симметрии третьего порядка и через СО-группу второй иминной группы тетрапептида.

Методической основой такого анализа является наличие у левой спирали типа поли-l-пролин II псевдо оси симметрии второго порядка, перпендикулярной оси третьего порядка (см. Рис.2).

Это дает основание предполагать возможность образования прочного комплекса между левоспиральными участками полипептидных цепей и малой и большой бороздками ДНК в местах расположения осей симметрии второго порядка двойной спирали ДНК.

Чтобы решить эту задачу достаточно наглядно, следовало проанализировать контакты структуры типа поли-*l*-пролин II на одиночных участках полипептидных цепей белков, а этому условию, как известно, удовлетворяют линкерные участки. Поэтому в данной работе был предпринят поиск линкерных участков полипептидных цепей в белках, среди них выделены ДНК-связывающие белки, а далее проанализирована стереохимия вторичных структур линкерных участков этих белков и среди них отобраны те, которые находятся в левой спирали типа поли-*l*-пролин II, будучи в комплексе с ДНК.

Для поисков линкерных участков использовались базы данных PDB, SCOP, а также база данных линкеров: <http://ibivu.cs.vu.nl/>.

Метод поиска линкеров оригинален: из базы данных SCOP сначала выбирались домены по ряду сформулированных признаков. Участок пептида между доменами трактовался как линкер. Рассматривали и подвергали дальнейшему стереохимическому анализу только цельные линкеры. Обратим внимание на важность линкерных участков для ДНК-белкового узнавания: разрыв линкера обычно сопряжен с патологией.

Глава 3. Термодинамический анализ механизмов влияния иминокислот – пролина и оксипролина на физические характеристики коллагенов.

В этой главе приводятся основные результаты анализа влияния иминокислот на термодинамические характеристики структур

коллагенового типа в коллагенах из различных источников. Установлено, что основной механизм увеличения энтропии системы белок-вода при увеличении содержания иминокислот в полипептидной цепи состоит в изменении числа кооперативных участков, выявляющихся при плавлении фибриллярной макромолекулы. Разброс физических характеристик кооперативных единиц определяет, в частности, разброс значений параметров водородных связей, что проявляется в уширении полос NH-валентных колебаний, т.е. в уширении полуширин переходов в постденатурационных структурах. Таким образом, основной механизм влияния иминокислот на термодинамические характеристики коллагенов связан со сложным ходом процесса денатурации, при котором механизмы дегидратации-гидратации нативного и денатурированного состояний существенно меняются при замене любых аминокислот на иминокислоту.

В данной главе, помимо акцента на анализ уникальной структуры обращается внимание на то, что коллаген является системным белком, определяющим значительное число процессов структурообразования в биологических объектах на разных уровнях их организации, прежде всего – на клеточном и тканевом. Однако, невзирая на значительное количество работ, затрагивающих самые разные стороны структурообразования и функционирования коллагенов, принципиального прорыва в понимании закономерностей образования и стабилизации этих белковых структур до сих пор нет.

Достаточно большая неопределенность в наших знаниях о белковых структурах связана с иминокислотами, которые, как оказалось, не только играют ключевую роль в стабилизации трехцепных макромолекул коллагенов, но и они же определяют

необычные физические свойства коллагеновых макромолекул. Пролин входит в список основных, так называемых, кодируемых аминокислот и обладает уникальной химической структурой. Из-за наличия пирролидинового цикла в нем отсутствует N-H-группа, способная при адсорбции воды служить донором водородной связи. Тот же пирролидиновый цикл фиксирует двугранный угол ϕ в основной цепи в районе -60° , создавая тем самым существенные конформационные ограничения.

Пролин наилучшим способом подходит для третьего типа вторичной структуры белков – левой спирали типа поли-l-пролин II (пп II). Спираль обладает псевдо симметрией C_3 и служит основой фибриллярной части коллагена, представляющего собой уникальный комплекс трех спиралей типа поли-l-пролин II, и также достаточно часто встречается в глобулярных белках.

Растворимость пролина в воде доходит до 7 M, в то же время он хорошо растворим в водноспиртовых смесях с большим содержанием спирта. СО-группа пролина более электроотрицательна, чем соответствующие карбонильные группы других аминокислот и является поэтому наиболее сильным акцептором протонов. Расположение водных мостиков вокруг одиночной полипептидной цепи поэтому зависит расположения иминокислот. При включении пролина в полипептидную цепь из-за уменьшения количества и хаотизации распределения доноров протонов в полипептидной цепи сокращаются в размерах области кооперативной гидратации пептидных групп, т.е. растет энтропия одиночной полипептидной цепи.

Мы провели термодинамический анализ результатов калориметрии коллагенов, выделенных из животных, далеких в

таксономическом отношении, по следующим причинам. Во-первых, коллагены имеют специфическую структуру, термостабильность которой соответствует температурным условиям среды обитания. Во-вторых, эта структура стабилизируется водой, причем упорядоченная гидратная оболочка образуется на основе карбоксильных СО-групп полипептидной цепи, т.е. при образовании водной спирали вокруг трехцепной макромолекулы коллагена не используются NH-группы, т.е. пептидный азот.

Специфическая водная структура вокруг коллагенов – единственный пример образования кооперативной сетки воды вокруг полипептида без NH-группы как донора протонов. Кооперативная сетка воды вокруг денатурированной одиночной цепи коллагена принципиально другая: NH-группы аминокислот являются важными опорами сетки Н-связей вокруг левой спирали типа поли-*l*-пролин II в аминокислотном полипептиде.

Таким образом, в процессе денатурации коллагена должна происходить перестройка спирали гидратной воды, т.е. изменяться геометрия и деформироваться симметрия спирали воды.

Каков же механизм перехода в денатурированное состояние с участием аминокислот? Две группы данных: термодинамические характеристики переходов в коллагенах, во-первых и изменения в спектрах водородных связей в процессах денатурации – во вторых – могут подсказать, какие стадии процесса денатурации определяют этапы изменения стабильной полипептидной трехцепной спирали и как регулируется этот процесс.

Важно отметить еще раз, что коллагены – белки с уникальной фибриллярной структурой: средняя величина проекции остатка на ось спирали в коллагенах с различным аминокислотным составом, в том

числе и содержанием иминокислот, определяемая методом рентгеноструктурного анализа, постоянна и составляет 2,86 Å. Таким образом, изменение физических свойств коллагенов определяется не изменениями их пространственной структуры, но физико-химическими свойствами пептидных групп и боковых радикалов.

В Табл. 1 приведены параметры тепловых переходов для макромолекул коллагенов с разным содержанием иминокислот.

Таблица 1. Термодинамические характеристики коллагенов разного происхождения.

Источник коллагена Из кожи	Число имино-кислот /1000 а.к.	Q, кал/г ----- ΔН, ккал/моль белка	ΔТ, полуширина Перехода	T _d К	ΔН ^{eff} , ккал/ моль	Кол-во кооперативных участков, N= ΔН/ ΔН ^{eff}	Энтропия, ккал/ моль К
Трески	155	10,65 ----- 3840	2,0	292,3	341	11,3	13,14
Мерланга	160 ?	10,0 ----- 3600	2,5	294,6	278	12,9	12,22
R. temp.	165	12,0 ----- 4320	2,5	304,4	297	14,5	14,19
R. gidib.	171 ?	13,4 ----- 4824	3,0	310,5	257	18,8	15,54
Щуки	199	13,6 ----- 4896	2,5	303,2	294	16,6	16,15
Крысы	226	17,0 ----- 6120	2,3	312,9	341	18,0	19,56
Курицы	228	17,2 ----- 6192	2,5	318,1	324	19,1	19,46

Как известно из калориметрических данных, с ростом количества иминокислот растут и энтальпия и энтропия денатурационных переходов. Долгое время полагали, что объяснение может состоять в дополнительных молекулах воды, адсорбируемых на тройной спирали коллагена в местах концентрации аминокислот. Однако, эксперименты показывают, что гидратация коллагена ткане-

но не видоспецифична, т.е. не коррелирует с содержанием аминокислот. В то же время в денатурированном состоянии упорядоченность систем NH-связей (по полуширине полос NH-валентных колебаний) падает с ростом числа аминокислот в макромолекуле, что и объясняет рост энтропии системы белок-вода.

В данных Табл.1 обращает на себя внимание увеличение числа кооперативных единиц при плавлении коллагенов по мере увеличения количества аминокислот.

Это можно понять, если учесть, что первый этап процесса денатурации коллагенов - это дегидратация тройной спирали макромолекулы*. При этом в местах локализации аминокислот на участках левой спирали типа поли-1-пролин II постденатурационная гидратация не происходит, что и приводит к разобщению участков тройной спирали коллагена на различные кооперативные единицы*.

Рассмотрим одну из простейших моделей этого процесса, позволяющих продемонстрировать эффект неоднородного уширения в колебательных спектрах. Рассмотрим длинную линейную молекулу, на которой имеются какие-либо молекулярные группы, расположенные на одинаковом расстоянии друг от друга. Т.е. эти группы образуют своего рода одномерную линейную периодическую решетку. Если мы рассмотрим колебательный спектр этих групп, то он будет достаточно узок, поскольку все эти группы находятся в одинаковых условиях и неоднородное уширение отсутствует. Но если из-за дегидратации части пептидных групп молекула перестает быть однородной и периодичность нарушается, то разные молекулы будут

* Подчеркнем, что при денатурации коллагена должна происходить перестройка гидратной оболочки спирали, а по данным В.И. Лобышева энергетика денатурационного перехода в коллагене определяется водой.

давать линии колебаний, сдвинутые друг относительно друга. Соответственно по сравнению с нативным состоянием суммарный спектр окажется уширенным.

Таким образом, механизм роста энтропии переходов в коллагенах под влиянием аминокислот связан со следующими этапами: 1) дегидратацией пептидных групп в местах расположения аминокислот; 2) разделением кооперативных областей на несвязанные части; 3) вариацией параметров NH-валентных колебаний в различных кооперативных единицах; 4) разрывом NH-пептидных связей; 5) лабиализацией динамики в местах расположения аминокислот.

Поэтому тонкая регуляция термостабильности коллагенов аминокислотами осуществляется как за счет изменения числа кооперативных участков в еще нативной структуре, так и за счет нарушения кооперативной гидратации постденатурационной одиночной левой спирали типа поли-l-пролин II в местах включения в нее аминокислот.

Глава 4. Левая спираль типа поли-l-пролин II в линкерных областях ДНК-связывающих белков

В этой главе изложены результаты исследований взаимодействий ДНК-левая спираль типа поли-l-пролин II. По базам данных белков и линкеров, как это описано в Методах, в рамках данной главы проведен поиск участков линкеров в конформации типа поли-l-пролин II, в составе комплексов ДНК-белок. В PDB найдено 268 комплексов РНК-белок и 778 комплексов ДНК-белок. В них найдено 1260 линкерных участков. Среди них найдено 73 комплекса линкер-ДНК. Показано, что средняя длина участков левой спирали типа ппII

составляет шесть остатков, причем пролин в них не является доминирующим остатком.

Знание доменной структуры белков, существенное в аспекте структуры и функций этих важнейших макромолекул, предполагает, наряду с информацией о доменах, сведения о междоменных областях или о так называемых линкерах. В отличие от доменных субъединиц (компактных, структурно независимых образований в составе белковой глобулы) линкеры не характеризуются плотной упаковкой, не образуют контактов с доменами белков но, вместе с тем, нередко являются самостоятельными структурными и функциональными единицами белка. Для нас линкеры интересны как пример непосредственных трехспиральных комплексов между одиночными левыми спиралями типа поли- I-пролин II и ДНК.

Мы провели разметку вторичной структуры для всех найденных линкеров. Отличие от ранее применённых методов разметки вторичной структуры состоит в использовании более точного разделения структур по классам, и впервые добавлен тип вторичной структуры типа поли-I-пролин-II, составляющий существенную долю всех встречающихся в белках конформаций. В существующей базе данных линкеров разметка левой спирали отсутствует.

Для нас особый интерес представляет взаимодействие линкеров в лево-спиральной конформации с ДНК. Оказалось, что лево-спиральные линкеры в основном располагаются в узкой бороздке ДНК, но в ряде случаев мы нашли их и в широкой.

Мы рассмотрели все лево-спиральные линкеры предполагая, что при определенных условиях возможно образования комплексов белок-нуклеиновая кислота (см. Табл. 2). Показано, что средняя длина

левоспирального линкера составляет шесть остатков, аминокислотный состав: Gln, Pro, Arg, Lys, Ile.

Наибольший интерес представляют левоспиральные линкеры, непосредственно контактирующие с ДНК или РНК (мы проанализировали 23 примера). В диссертации представлен большой графический материал.

Таблица 2. Фрагменты линкеров в конформации левой спирали типа поли-1-пролин II в комплексах с ДНК, содержащие пролин.

Идентификатор белка и цепи в банке PDB	Номера остатков	Аминокислотная последовательность
Pdb1ecr_A	229-237	Ile Lys Arg Pro Val Lys Val
pdb1ecr_A	279-300	Tyr Asp Ala Asp Asn Val Gln His Arg Tyr Lys Pro Gln Ala Gln Pro Leu Arg Leu Ile
pdb1fiu_A	52-70	Ser Glu Thr Val Ser Glu Arg Leu Pro Gly Gln Thr Ser Gly Asn Ala Phe
pdb1mse_C	138-148	Asn Pro Glu Val Lys Lys Thr Ser Trp
pdb1qf6_A	529-536	Ala Gly Phe Phe Pro Thr
pdb2up1_A	88-108	Ala Val Ser Arg Glu Asp Ser Gln Arg Pro Gly Ala His Leu Thr Val Lys Lys Ile
pdb6pax_A	62-77	Ile Arg Pro Arg Ala Ile Gly Gly Ser Lys Pro Arg Val Ala

В главе приводится ряд примеров контактов левоспиральных линкеров с ДНК и РНК. Отмечается, что симметрия расположения пролиновых остатков не допускает образования кооперативной сетки воды, длиной, большей одного витка спирали волю. Контакты, как и предполагалось, допускают возможность правильного расположения оси симметрии второго порядка, перпендикулярной оси ДНК, и псевдо оси симметрии второго порядка левоспирального участка.

Глава 5. Обсуждение результатов

В главе проведено общее обсуждение данных глав 3 и 4, с привлечением данных по расчетам гидратации пептидов, с различным расположением пролина в полипептидной цепи. Приведем только короткое резюме.

В данных Табл.1 и Рис. 3 обращает на себя внимание увеличение числа кооперативных единиц при плавлении коллагенов по мере увеличения количества иминокислот.

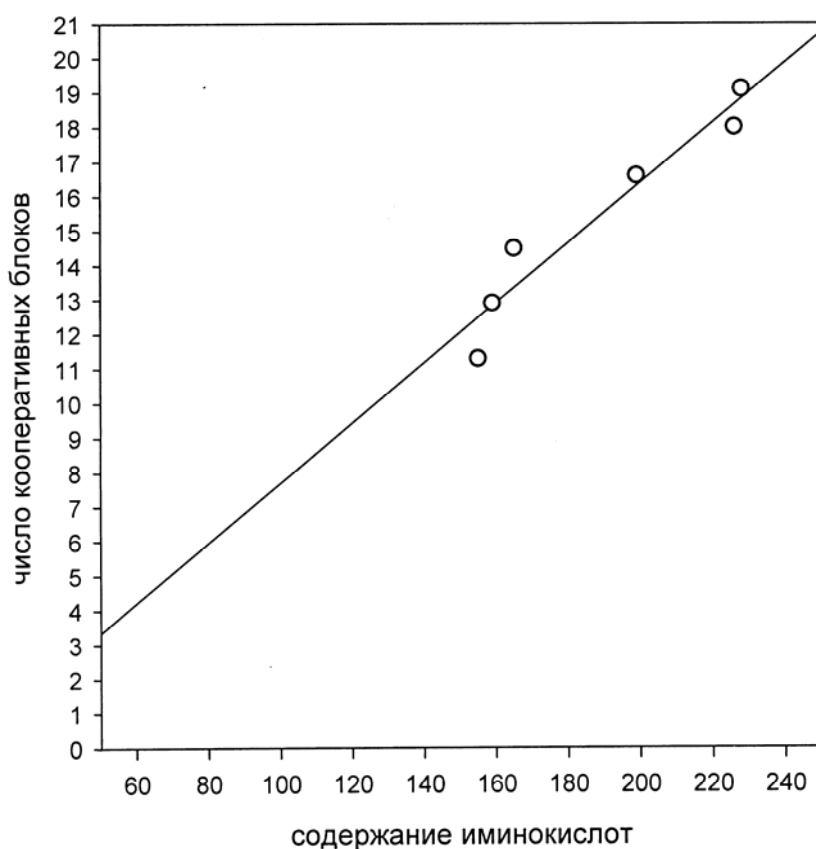


Рисунок 3. Зависимость числа кооперативных единиц в коллагенах различного происхождения от содержания иминокислот.

Это легко понять, если иметь в виду, что первый этап процесса денатурации есть дегидратация тройной спирали трехцепной макромолекулы, а в местах локализации иминокислот на участках левой спирали типа поли-*l*-пролин II постденатурационная гидратация не происходит. Это и различные параметры спирали вдоль

макромолекулы коллагена, вызывающие деформацию спирали гидратной воды, приводят к разобщению участков тройной спирали коллагена на различные кооперативные единицы.

Таким образом, механизм роста энтропии переходов в коллагенах под влиянием иминокислот, повторим еще раз, связан со следующими этапами: 1) дегидратацией пептидных групп в местах расположения иминокислот; 2) разделением кооперативных областей на несвязанные части; 3) вариацией параметров NH-валентных колебаний в различных кооперативных единицах; 4) разрывом NH-пептидных связей; 5) лабильностью динамики в местах расположения иминокислот. Именно таким образом гидрофобный боковой радикал не приводит к нерастворимости полипептида с пролином – поли-*l*-пролина, а тонкая регуляция термостабильности коллагенов иминокислотами осуществляется как за счет изменения числа кооперативных участков в еще нативной структуре, так и за счет нарушения кооперативной гидратации постденатурационной одиночной левой спирали типа поли-*l*-пролин II в местах включения в нее иминокислот.

Такое же несовершенство гидратной оболочки участков левой спирали типа поли-*l*-пролин II имеет место в линкерных областях белков, что, способствуя дегидратации части пептидных групп, обеспечивает непосредственные контакты ДНК и линкера, управляемые их собственной симметрией. При этом расположение пролинов определяет участок плотного контакта ДНК-белок.

Выводы

1. Установлено, что важный аспект механизма увеличения энтропии системы белок-вода при увеличении содержания иминокислот в полипептидной цепи состоит в изменении числа кооперативных участков, выявляющихся при плавлении фибриллярной макромолекулы.
2. Показано, что механизм влияния иминокислот на термодинамические характеристики коллагенов связан со сложным ходом процесса денатурации при котором механизмы гидратации-дегидратации существенно меняются при замене иминокислот на любую аминокислоту.
3. На простейшей модели одномерной решетки, образуемой длинной линейной молекулой, на которой имеются какие-либо молекулярные группы, расположенные на одинаковом расстоянии друг от друга, продемонстрирован эффект неоднородного уширения в колебательных спектрах и установлена его связь с содержанием пирролидиновых колец.
4. Установлено, что тонкая регуляция термостабильности коллагена иминокислотами осуществляется как за счет изменения числа кооперативных участков в еще нативной структуре, так и за счет нарушения кооперативной гидратации в постденатурационной левой спирали типа поли-1-пролин II в местах включения в нее иминокислот.
5. Установлено, что кооперативный характер гидратации одиночной полипептидной цепи в конформации поли-1-пролин II определяется последовательностью и симметрией расположения пролинов.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Рубин М.А., Тиктопуло Е.И., Намиот В.А., Туманян В.Г., Есипова Н.Г. *К вопросу о механизмах влияния аминокислот на физические характеристики коллагенов.* Биофизика, 2008, т. 53, с. 407-410.
2. Власов П.К., Будзко А.В., Рубин М.А., Туманян В.Г., Макаров А.А., Есипова Н.Г. *Левая спираль типа полипролин II в линкерных областях ДНК-связывающих белков.* Биофизика, 2008, т. 53, с.1149-1150.
3. Филатов И.В., Мильчевский Ю.В., Опарина Н.Ю., Рубин М.А., Есипова Н.Г. *Расчет трехмерной структуры молекулы коллагена III человека.* III съезд биофизиков России, 24-29 июня 2004 г, Воронеж, стр. 117.