

# ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ

Том I

№ 2

1959

## О СВЯЗИ ПРОСТРАНСТВЕННОЙ СТРУКТУРЫ ФИБРИЛЛЯРНЫХ БЕЛКОВ С ИХ ХИМИЧЕСКИМ СТРОЕНИЕМ

*Н. С. Андреева*

Последние годы ознаменовались значительными успехами в изучении последовательности расположения аминокислотных остатков в полипептидных цепях белков. Для фибрillлярных белков в этом направлении получены некоторые интересные данные.

Вместе с тем пространственная структура фибрillлярных белков широко исследовалась при помощи различных методов, в частности метода рентгеноструктурного анализа, инфракрасной спектроскопии, электронной микроскопии и др.

Накопленный к настоящему времени экспериментальный материал позволяет сделать некоторые обобщения, которые могут оказаться полезными для дальнейшего изучения структуры белков. В настоящей работе делается попытка связать некоторые закономерности пространственной и химической структуры фибрillлярных белков.

Как известно, по особенностям конфигурации цепей фибрillлярные белки принято делить на две группы: группу кератина — миозина — эпидермиса — фибриногена ( $\kappa - m - e - f$ ), включающую две подгруппы —  $\alpha$  и  $\beta$ , и группу коллагена. Согласно Астбери, белки, относящиеся к одной структурной группе, характеризуются определенным типом конфигурации цепей, что находит свое отражение на их рентгеновских дифракционных картинах. Необходимо отметить, что под конфигурацией полипептидной цепи в данном случае подразумевается не конфигурация всей цепи как целого, а только та геометрическая форма, которую могут принимать сегменты цепей на упорядоченных участках структуры. На этих сегментах определенное взаимное расположение некоторых атомов пептидной цепи периодически повторяется по крайней мере вдоль одного направления (оси цепочки).

Классификация Астбери, предложенная еще в 30-х годах, оказалась весьма удобной, так как действительно почти все известные фибрillлярные белки попали в одну из двух указанных групп. Вместе с тем оказалось возможным использовать рентгенографические данные в качестве определенной структурной характеристики белков. Это сыграло большую роль, например, при поисках новых типов коллагенов.

Однако можно сделать попытку классифицировать фибрillлярные белки на несколько иной основе, связав более тесно их химическую и пространственную структуру. Можно разбить известные конфигурации полипептидных цепей фибрillлярных белков на две группы и отнести к первой из этих групп те конфигурации, которые обусловлены только свойствами остовов пептидных цепей и нечувствительны к характеру и последовательности боковых групп вдоль пептидной цепи. Ко второй группе следует отнести те конфигурации, которые, наоборот, обусловлены спецификой чередования определенных аминокислотных остатков. Здесь сразу следует отметить, что такое разделение является несомненно условным. Конфигураций абсолютно нечувствительных к характеру последовательности аминокислот нет. Можно говорить лишь о тех структурных формах цепи,

которые допускают чередование весьма различных в структурном отношении боковых групп и не ограничиваются какой-то строго определенной последовательностью аминокислот. Вместе с тем эти конфигурации в общем случае могут не допустить размещения нескольких, но не многих видов остатков.

С другой стороны, можно говорить о тех структурных формах, которые образуются только при определенной последовательности аминокислот и ни в каких других случаях возникнуть не могут.

Рассмотрим экспериментальные факты. Одной из конфигураций первого типа является  $\alpha$ -спираль [1]. По-видимому, это единственная экспериментально доказанная конфигурация полипептидной цепи, в большой мере нечувствительная к последовательности аминокислотных остатков. Это следует из стереохимических особенностей  $\alpha$ -формы, стабильность которой обеспечивается водородными связями групп, принадлежащих только хребту пептидной цепочки. Естественно, что  $\alpha$ -спираль должна нарушаться в тех местах, где стереохимические условия образования прочной связи между боковыми цепями оказываются с ней несовместимы (по-видимому, иногда при образовании полярных и S—S-связей). Как известно,  $\alpha$ -спираль должна также нарушаться в тех местах, где располагаются остатки иминокислот, которые в ней не размещаются [2]. Как наиболее компактная и стабильная конфигурация пептидной цепи, в большой мере нечувствительная к последовательности аминокислот,  $\alpha$ -спираль должна возникать на отдельных участках цепей многих белков. Это подтверждается тем фактом, что  $\alpha$ -конфигурация обнаружена в большинстве фибрillлярных белков, именно в кератине, миозине, фибриногене, в волокнистых белках нервных тканей и других белках, не имеющих ничего общего между собой в химической структуре.

Вполне естественно, что она обнаружена и на отдельных фрагментах молекул многих глобулярных белков [3]. Вместе с тем было показано, что количество  $\alpha$ -формы убывает с ростом числа полярных групп в белке [3].

Следует заметить, что  $\alpha$ -спираль обнаружена и в большинстве синтетических полипептидов с самым различным химическим строением [4].

Все эти факты свидетельствуют о сравнительно большой индифферентности  $\alpha$ -спирали к химической структуре пептидной цепи.

Ко второй группе следует отнести фибронин шелка и коллаген. К настоящему времени накоплены достаточно твердые данные, свидетельствующие о том, что особые конфигурации цепей, наблюдаемые в этих белках, обусловлены не их специфическим аминокислотным составом, а особенностями чередования аминокислот в пептидной цепи. Хотя для этих белков полная последовательность аминокислот еще не определена, однако имеются данные, которые позволяют охарактеризовать некоторые общие закономерности этого расположения.

Для обоих этих белков оказалось характерным чрезвычайно резкое отклонение от закона статистичности. Наиболее полные данные о последовательности расположения аминокислот имеются для фибронина шелка. В этом плане фибронин шелка *Bombyx mori* изучался Иоффе [5], Леви и Слободяном [6] и Люка [7]. В нем были обнаружены области скоплений остатков глицина и аланина. Для этих областей оказалась характерной следующая последовательность: гли-ала-гли-ала-гли-[сер-гли-(ала-гли)<sub>2</sub>]<sub>8</sub> — сер-гли-ала-ала-гли-тир. Следует еще раз подчеркнуть, что последовательность аминокислот такого типа никак не согласуется с представлением о статистичности в расположении остатков, если иметь в виду общий аминокислотный состав фибронина. В последнем случае приблизительно каждый десятый остаток был бы серином, а двадцатый тирозином и не было бы столь правильного чередования остатков глицина и аланина, замещаемого серином. Легко видеть, что основу химической структуры отдельных участков молекулы фибронина шелка об-

разует полимер вида  $(\text{гли-}\alpha\text{-ал})_n$  и с редким замещением одного из остатков аланина на серин.

Конфигурация цепи фиброна шелка *Bombyx mori* известна как  $\beta$ -форма, т. е. форма полностью или почти полностью вытянутой пептидной цепи [8]. В общих чертах это, по-видимому, так, однако фиброн шелка *Bombyx mori* имеет некоторые специфические особенности строения, что отличает его от других  $\beta$ -белков. Помимо того, что рентгенограмма фиброна шелка *Bombyx mori* свидетельствует о значительной упорядоченности структуры, она имеет свои, характерные только для этого белка отличительные признаки. На ней проявляется два максимума распределения расстояния между слоями пептидных цепей, соответствующие  $2\text{\AA}$  и  $5,9\text{\AA}$  [9]. Такие максимумы не были обнаружены в других белках, но были найдены для полимера глицил-*l*-аланина. Более того, был обнаружен полный изоморфизм рентгенограмм этого полимера с рентгенограммами упорядоченной

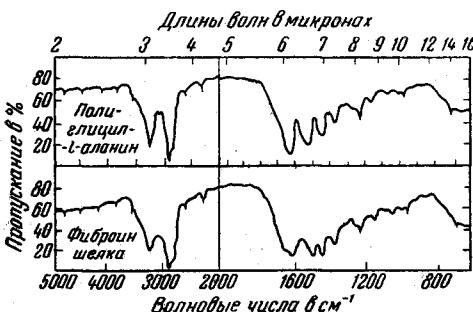


Рис. 1. Сравнение инфракрасных спектров поглощения фиброна шелка и полимера глицил-*l*-аланина [10]

части фиброна шелка и тождественность инфракрасных спектров поглощения [10] (рис. 1). Эти данные несомненно свидетельствуют о том, что пространственная структура упорядоченных участков фиброна шелка *Bombyx mori* обусловлена специфическим чередованием аминокислот, а именно доминирующей ролью последовательности (гли-*l*-ала), на этих участках. Расстояния 2 и  $5,9\text{\AA}$  интерпретируются в настоящее время как расстояния между слоями пептидных цепей, возникающие в том случае, когда между ними находятся либо только водороды глицина, либо  $\text{CH}_2$ -группы аланина [9]. Известна вторая разновидность фиброна шелка — фиброн шелка *Tussah*. Последовательность аминокислот в этом белке еще не изучалась. Однако рентгенографически был обнаружен изоморфизм структуры его упорядоченных областей со структурой поли-*l*-аланина [11]. Это дает основание полагать, что в фиброне шелка *Tussah* существуют области скоплений остатков аланина, которые определяют конфигурацию его цепей.

В коллагенах были тоже обнаружены резкие отклонения от закона статистичности. Химическая структура коллагена наиболее обстоятельно исследуется Грассманом. Результатом работы Грассмана [12] явилось обнаружение в коллагене длинных участков цепи, содержащих практически только остатки иминокислот и глицина. Например, выделенный из частичных гидролизатов пептид SF имел следующую структуру:  $\text{H}_2\text{N-гли-(сер, тре, лей, ала, гли)-[10 про, 5 оксипро, 12 гли, 2 ала, 1-2 сер, 2 тир, 1 глут-фен-глу-лей-асп - COOH}$ .

Вместе с тем, участки цепи с высоким содержанием полярных остатков совсем не содержали остатков иминокислот.

Аналогичные результаты получил Гросс, исследуя продукты расщепления коллагена коллагеназой [13]. К таким же выводам пришла в своей работе Мандл [14]. Отсутствие статистичности в расположении аминокислот в коллагене и наличие скоплений остатков иминокислот и глицина было показано в одной из первых наших работ по структуре коллагена, в которой изучалась зависимость количества упорядоченной формы в различных коллагенах от их аминокислотного состава [15]. Эти выводы нашли подтверждение в перечисленных выше химических работах.

Последовательность аминокислот на участках скоплений глицина, пролина и оксипролина пока неизвестна. Кронер, Табров и

Мак-Гэрр [16], исследуя гидролизаты желатины, пришли к выводу, что для коллагена должна быть характерна последовательность (гли-про-оксипро)<sub>n</sub>. Такие же выводы сделали в результате своих исследований Шредер, Кей и др. [17], однако общий аминокислотный состав пептидов, полученных Грассманом, свидетельствует о том, что количество остатков иминокислот и глицина на этих участках приблизительно равны. К этому же выводу пришли мы на основании наших исследований [15]. Если последовательность глицин-пролин-оксипролин верна, то избыточный глицин должен, в свою очередь, концентрироваться, и в гидролизатах должны наблюдаться в достаточном количестве пептиды и трипептиды глицина, чего на самом деле нет. Кроме того, в последних работах Порошина, Казаренко и Шибнева [18] обнаружена чрезвычайно сильная тенденция пептидов, содержащих остатки иминокислот и глицина, к циклизации с последующим разрывом пептидной связи в различных местах в зависимости от pH. Все это заставляет сомневаться в указанной последовательности. Таким образом последовательность аминокислот для коллагена не изучена столь детально, как для фиброна шелка. Однако связь пространственной и химической структуры его цепей достаточно ясна. Наличие четкой линейной зависимости количества упорядоченной формы от содержания остатков иминокислот и глицина (рис. 2) в различных коллагенах не оставляет сомнений в том, что упорядоченная форма образуется на участках скоплений этих остатков [15].

Сходство некоторых физико-химических характеристик упорядоченной формы коллагена и полимеров пролина и сополимеров пролина и глицина [19, 20] также свидетельствует в пользу этого предположения.

В настоящее время неясно, какая последовательность характерна для участков, где скапливаются иминокислоты и глицин. Разработанные модели структуры коллагена базируются на двух вариантах последовательности: (гли-про-оксипро)<sub>n</sub> [20, 21, 22] и (гли-про или оксипро)<sub>n</sub> [23]. Выбор между ними может быть произведен двумя путями: либо прямым определением чередования аминокислот вдоль цепи, либо поисками полимера, изоморфного упорядоченной части коллагена.

Таким образом, в принятой классификации первая группа фибрillлярных белков должна включать все известные  $\alpha$ -белки, а именно миозин, тропомиозин, фибриноген, белки жгутиков бактерий, фибрillлярные белки нервных тканей, различные кератины и белки эпидермиса.

К белкам второй группы должны относиться различные коллагены и фибронин шелка. Возможно, что к этой группе следует отнести и кератин пера, однако, чтобы решить этот вопрос окончательно, необходимы специальные исследования.

Можно полагать, что принятая классификация должна охватить все существующие фибрillлярные белки, хотя многие из них еще не изучены или мало изучены как в плане химическом, так и в плане их пространственной структуры. Возможно, что кроме  $\alpha$ -формы существуют другие конфигурации пептидной цепи, не чувствительные или мало чувствительные к последовательности аминокислот в цепи.

Мы сделали попытку найти рентгенографический критерий, при помощи которого можно было бы установить экспериментально, к какой из указанных двух групп относится тот или иной белок.

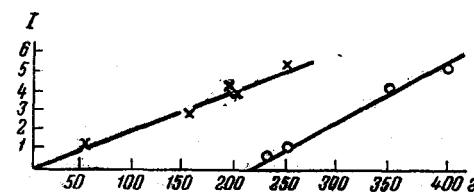


Рис. 2. Зависимость количества упорядоченной фазы от количества остатков иминокислот (левый график) и глицина (правый график) в молях остатков на  $10^6$  г белка [15]

Можно поставить следующий вопрос: какой характер должна носить упаковка цепей в том случае, если вдоль цепи чередуются самые различные в структурном отношении боковые группы и, следовательно, регулярная конфигурация цепи может возникнуть только за счет свойств остатва пептидной цепочки.

Естественно, что упаковка цепей должна быть сильно искаженной. В лучшем случае цепи могут быть приблизительно параллельными благодаря возникновению солеобразных и водородных связей, а также связей типа S — S на отдельных участках. Расстояние между цепями не будет при этом строго определенной величиной: там, где встретятся две длинные боковые группы, цепи раздвинутся и, наоборот, они приблизятся там, где будут располагаться короткие группы, которые способны образовывать связи. Если в то же время допустить, что благодаря водородным связям между CO- и NH-группами пептидных остатков остав цепи сохраняет упорядоченную структуру, система в целом будет являться структурой с одномерной периодичностью, единственный порядок в структуре — это периодичность в пространственном расположении атомов оставов цепей.

Структуры с одномерной периодичностью дают специфические рентгенограммы. Теоретический расчет дифракционных картин для систем такого рода применительно к полимерам и фибриллярным белкам был опубликован в наших работах [24, 25]. Как показывают расчеты, в случае дополнительных локальных искривлений и искажений в цепях, что неизбежно при большой стереохимической разнице боковых групп, на рентгенограммах должны отсутствовать диагональные рефлексы, меридиональные отражения должны иметь форму вытянутых штрихов, а на экваторе должны наблюдаться одно-два диффузных пятна, соответствующих аморфной упаковке параллельных цепей. Такие рентгенограммы могут быть свидетельством существования сильных искажений в упаковке цепей и, следовательно, чередования вдоль цепи самых различных в структурном отношении аминокислотных остатков.

Регулярные конфигурации (сегментов цепей), обусловленные специфическим расположением аминокислот в молекуле, могут возникнуть, очевидно, в тех случаях, когда определенные группы остатков повторяются регулярно или квазирегулярно вдоль цепи, а также при скоплении определенных групп на отдельных участках цепной молекулы.

При этом возможна более или менее правильная упаковка цепей. При регулярном расположении небольших групп аминокислот вдоль соседних цепей расстояния между ними будут меняться уже по некоторому периодическому закону. При скоплении определенных групп расстояние между цепями на этих участках может быть выдержано достаточно строго. Таким образом, в структуре фибриллярного белка на отдельных участках могут возникнуть области трехмерного или двумерного порядка. Правда, этот порядок будет только ближним, а не дальним, так как скопления и периодичность здесь, видимо, нельзя считать абсолютным и, кроме того, дальний порядок в полимерных структурах — весьма условное понятие.

Трехмерный порядок дает специфические эффекты на рентгенограмме — отрезки сильно размытых дебаевских колец, как с меридиональными и экваториальными максимумами, так и с диагональными. Получив от фибриллярного белка рентгенограмму такого типа, можно сразу сказать, что в нем либо существуют скопления аминокислот определенного сорта на отдельных участках цепи, либо имеется определенная периодичность в расположении небольших групп остатков. Такие особенности в расположении аминокислот связаны с резкими отклонениями от закона статистичности.

Дифракционные картины фибриллярных белков  $\alpha$ -типа полностью соответствуют рассчитанным нами рентгенограммам для структур с одно-

мерной периодичностью. Действительно, на рентгенограммах  $\alpha$ -белков наблюдаются два меридиональных штриха при  $5,1$  и  $1,5$  Å и очень диффузный экваториальный максимум при  $\sin \theta / \lambda \sim 0,05$ . Кроме этого, имеется диффузное гало в области  $\sin \theta / \lambda \sim 0,12$ , характерное для всех высоко-молекулярных структур и обусловленное неупорядоченными участками волокна. Диагональных максимумов на рентгенограммах  $\alpha$ -белков нет. Можно полагать, что в случае, если в дальнейшем для какого-либо белка будет обнаружена дифракционная картина, отличная от  $\alpha$ -рентгенограмм, но состоящая из меридиональных штрихов и размытых экваториальных пятен, мы будем иметь дело с новой конфигурацией полипептидной цепи, обусловленной только свойствами ее остова.

На рентгенограммах фибринов шелка, а также коллагенов четко проявляются признаки ближнего, соответственно, двумерного и трехмерного порядка в упаковке цепей. Следовательно, здесь мы должны иметь дело с более или менее регулярной упаковкой цепей на отдельных сегментах и, следовательно, с конфигурациями, обусловленными особым расположением специфических аминокислот в молекуле.

Как следует из изложенного, принятая классификация позволяет разделить фибрillлярные белки на группы, существенно различающиеся особенностями химического строения. Если для белков первой группы характерно чередование самых различных в структурном отношении аминокислот вдоль цепи и вероятно их статистическое расположение, в белках второй группы определенные виды остатков образуют сравнительно большие скопления и обуславливают возникновение специфической конфигурации цепей. Общий аминокислотный состав белков второй группы отличается заметным количественным преобладанием некоторых видов остатков над остальными. По-видимому, эти остатки наиболее эффективно осуществляют свои функции в том случае, если они скапливаются на отдельных участках молекул. Скопления однородных групп облегчают кристаллизацию в волокнах, что создает необходимые условия для возникновения более прочных структур в соединительных, опорных и предохранительных тканях организма.

### Выводы

1. Проанализирована зависимость пространственной структуры важнейших фибрillлярных белков от их химического строения. Известные конфигурации полипептидных цепей фибрillлярных белков разбиты на две группы — на конфигурации, нечувствительные к последовательности аминокислот вдоль пептидных цепей, и на конфигурации, определяемые специфическим расположением аминокислотных остатков.

2. Показано, что к первой группе, включающей все  $\alpha$ -структуры, могут относиться белки со статистическим или близким к нему расположением аминокислотных остатков вдоль цепи. Резкие отклонения от закона статистичности некоторых групп на отдельных участках приводят к возникновению специфической конфигурации цепи на отдельных фрагментах. Это характерно для белков группы коллагена и фибринов шелка.

3. Разработан рентгенографический критерий определения типа конфигурации цепи. Показано, что при статистическом или близком к нему расположении аминокислот наиболее упорядоченными структурами должны быть структуры с одномерной периодичностью в упаковке сегментов цепей. При наличии скоплений определенных групп на отдельных участках цепей возможно возникновение областей ближнего двумерного или трехмерного порядка.

## ЛИТЕРАТУРА

1. L. Pauling, R. B. Corey, H. R. Branson, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., **37**, 205, 1951.
2. A. G. Szent-Gyorgyi, C. Cohen, Science, **126**, 697, 1957.
3. P. Doty, Collection of Czechoslovak Chemical Communications, **22**, 5, 1957 (International Symposium on Macromolecular Chemistry, 1957).
4. C. H. Bamford, A. Elliot, W. E. Hanby, «Synthetic polypeptides». Berksbive, England, 1956.
5. К. Г. Иоффе, Биохимия, **19**, 495, 1954.
6. M. Levy, E. Slobodian, Cold Spring Harbor Symposia, Quant. Biol., **14**, 113, 1949.
7. F. Lukas, G. T. B. Shaw, S. G. Smith, Nature, **178**, 860, 1956.
8. K. H. Meyer, H. Mark, Ber., **61**, 1932, 1928.
9. R. E. Marsh, L. Pauling, R. B. Corey, Bioch. Biophys. Acta, **16**, 1, 1955.
10. Yukichi Go, Junzo Noguchi, Masamoto Asai, Tadao Nakawa, J. Polymer Science, **21**, 147, 1956.
11. R. Marsh, R. B. Corey, L. Pauling, Acta Crystallogr., **8**, 740, 1955.
12. W. Graßmann и др. H-S. Z. Physiol. Chem., **306**, 123, 1956.
13. J. Gross, Recent Advances in Gelatine and Glue Research. Cambridge, 1957.
14. J. Mandl, Материалы международного биохимического конгресса, 1958.
15. М. И. Миллионова, Н. С. Андреева, Биофизика, **2**, 294, 1957.
16. D. Kroner, W. Tabroff, J. McCagg, J. Am. Chem. Soc., **75**, 4084, 1953.
17. W. A. Schroeder, L. M. Kay, J. Am. Chem. Soc., **76**, 3356, 1954.
18. К. Т. Поромин, Т. Д. Козаренко, В. А. Шибнев, Изв. АН СССР, Отд. хим. наук, 1958, 1129.
19. J. Kurtz, A. Berger, E. Katchalski, Recent Advances in Gelatine and Glue Research, p. 131. Cambridge, 1958.
20. A. Rich, F. H. C. Crick, Nature, **176**, 915, 1955.
21. G. N. Ramachandran, G. Kartha, Proc. Indian Acad. Sci., A, **42**, 215, 1955.
22. P. M. Cowan, S. McGavin, A. C. T. North, Nature, **176**, 1062, 1955.
23. И. М. Миллионова, Н. С. Андреева, Биофизика, **3**, 259, 1958.
24. Н. С. Андреева, В. И. Иверонова, Биофизика, **2**, 281, 1957.
25. N. S. Andreeva, V. J. Iveronova, J. Polimer Sci., **31**, 257, 1958.

## ON THE RELATION BETWEEN THE CONFIGURATION OF FIBROUS PROTEINS AND THEIR CHEMICAL STRUCTURE

N. S. Andreeva

## Summary

An analysis has been made of the dependence of the configuration of the more important fibrous proteins on their chemical structure. The known configurations of the polypeptide chains of fibrous proteins are divided into two groups; namely, those insensitive to the sequence of the amino acids along the peptide chains and those determined specifically by the arrangement of the amino acid residues.

It has been shown that to the first group, including all  $\alpha$ -structures, may be referred proteins with statistical or near statistical arrangement of amino acid residues along the chain. The sharp deviation from the stochastic law—accumulation of a number of groups in some regions of the chains—leads to the appearance of a specific configuration in individual chain fragments. This is characteristic of proteins of the collagen group and silk fibroin.

An x-ray diffraction criterion has been developed for determining the type of configuration of the chain. It has been shown that for the statistical or near statistical arrangement of the amino acids the most ordered structures should be those with one-dimensional periodicity in the chain segment packing. In the presence of accumulations of definite groups in given sections of the chain the formation is possible of regions of short range two- or three-dimensional order.