

UNIVERSIDAD IBEROAMERICANA

INCORPORADA A LA U.N.A.M.

ESCUELA DE CIENCIAS QUIMICAS.

EL ENLACE INTRAMOLECULAR EN COLAGENA.

MARGARITA ZEICHNER GANCZ

QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

1 9 7 0



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO QUE REVISÓ Y APROBO LA PRESENTE TESIS

PRESIDENTE:

JUAN JOSE MANDOKI

VOCAL:

MARGARITA WATTY

SECRETARIO:

JESUS GARCILASO

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

INSTITUTO NACIONAL DE LA NUTRICIÓN.

DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA

SUSTENTANTE:

MARGARITA ZEICHNER GANCZ

ASESOR DEL TEMA:

JESUS GARCILASO

SUPERVISOR TECNICO:

MARCOS ROJKIND

CON TODO MI AMOR:

a L U I S:

a tu memoria papá.

a L A U R A:

gracias mamá

con cariño:

a mis hermanos:

Pepe  
Isabel  
Andrés  
Isidoro  
Fernando

a Luisito

a mis tios y primos.

a los que han sido, son y seran  
mis amigos y compaÑeros.

a mis maestros

al Dr. Marcos Rojkind.

## INDICE

INTRODUCCION.....	1
MATERIAL.....	19
METODOS.....	20
RESULTADOS Y DISCUSION.....	29
CONCLUSIONES.....	70
BIBLIOGRAFIA.....	73

## I N T R O D U C C I O N .

La palabra Colagena deriva del Frances: Collagène. Antiguamente se le definía como constituyente del tejido conectivo que al calentarse se transforma en Gelatina.

La colágena está ampliamente difundida en la escala zoológica, encontrándose desde esponjas hasta mamíferos. Es el principal componente del tejido conectivo laxo y constituye del 20 a 25% de las proteínas totales en mamíferos(1).

Su estructura varía en las diferentes regiones del organismo, según la función que desempeña. Así, encontramos que en el periostio, en las cápsulas fibrosas de varios órganos y en la piel, las fibras colágenas se encuentran entrelazadas sin orientación determinada aparente, dándole al tejido su resistencia característica. En los tendones y ligamentos, en donde se requiere mayor fuerza y elasticidad, las fibras se unen paralelamente formando haces o cordones gruesos. En las paredes de vísceras, forman redes de fibras elásticas que permiten su fácil distensión. En la córnea, son fibrillas muy finas orientadas de tal manera que permiten el paso de la luz. En el hueso, se encuentran organizadas en mallas que sirven de centro de nucleación para la calcificación(2).

La colágena tiene gran importancia en medicina, sobre todo en cirugía, en donde se utiliza como material de sutura, para plástesis en Oftalmología, como material para cubrir heridas, etc. Se



encuentra involucrada en los procesos de cicatrización, así como en el proceso normal de envejecimiento (3). Se encuentra afectada en forma primaria en enfermedades como la Artritis reumatoide, Lupus eritematoso, Poliarteritis nodosa, Dermatomiositis, Esclerodermia, etc. y está relacionada con enfermedades hereditarias como en el Síndrome de Marfan y Osteogénesis imperfecta.

El recambio metabólico de la colágena es casi nulo en adultos, sin embargo, en el animal joven hay un lento recambio que varía en velocidad de acuerdo con el tejido de que se trate, siendo más activo en el útero y totalmente inerte en los tendones, aorta, etc. (4).

#### GENERALIDADES.

La unidad básica de la colágena (Tropocolágena), tiene una longitud de 3000 Å y un diámetro de 15 Å (5). Su peso molecular aproximado es de 300 000 (6). Está formada por tres cadenas polipeptídicas (cadenas  $\alpha$ ) cada una de ellas con un peso molecular mayor de 90 000 (7); dos de las cadenas son idénticas y se denominan  $\alpha 1$ , mientras que la tercera tiene una composición de aminoácidos diferente y se denomina  $\alpha 2$  (8). En la colágena de piel de Bacalao, las tres cadenas tienen una composición de aminoácidos diferente y se les ha denominado  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  y  $\alpha 3$  (9) (10). Algunos autores han sugerido también que la colágena extraída de piel de Becerro (11) (12), colágena de hueso de pollo (13), y aún la colágena de piel de Rata (12), tiene tres cadenas  $\alpha$  distintas.

Kang y colaboradores (14) han encontrado otro tipo de cadena  $\alpha$  encolágena de piel de pollo, que es igual a la cadena  $\alpha 1$  pero le falta un fragmento. Explican este hecho por un mecanismo de degradación enzimática que puede quitar este fragmento, o bien, puede deberse a defectos de extracción y que el ácido con el que extraen pudiera romper un sitio lábil de la molécula. Esto podría explicar las distintas cadenas  $\alpha$  en diferentes especies, excepto en la piel de Bacalao. La colágena joven, desnaturalizada por calor, se separa en sus tres componentes originales y conforme va madurando, aparecen dímeros ( $\beta$ ) y trímeros ( $\gamma$ ). El dímero formado por dos  $\alpha 1$  se llama  $\beta 11$  y el formado por  $\alpha 1 + \alpha 2$ ,  $\beta 12$ . El peso molecular de las cadenas  $\beta$  es de  $196\ 000 \pm 1000$ , o sea el doble de las  $\alpha$ . También se han encontrado componentes con peso molecular mayor de 300 000, de los cuales se sabe poco todavía.

Gallop y colaboradores (15), han sugerido la posibilidad de que las cadenas  $\alpha$  estén formadas por cuatro subunidades, cada una con un peso molecular de 25 000, unidas entre sí por enlaces sensibles a la acción de agentes nucleofílicos como hidroxilamina o hidrazina. Estos enlaces pueden ser ésteres o imidas. Petruska y Hodge (16) estudiaron fibras colágenas con el microscopio electrónico y vieron que la simetría presente no estaba de acuerdo con el modelo de subunidades presentado por Gallop y proponen un modelo diferente, en donde dos de las tres cadenas de la tropocolágena tienen 5 subunidades, mientras que la tercer cadena tiene 7. Por ser un modelo óptico, no determinan si la composición de aminoáci-

dos es igual o diferente en cada subunidad. Años más tarde, Butler (17) y Bernstein (18), estudiando la sensibilidad de la colágena a la hidroxilamina, demuestran que dos de los enlaces son posiblemente imidas del ácido aspártico y descartan la posibilidad de subunidades unidas por uniones tipo Ester.

A nivel de estructura molecular, los estudios con difracción de Rayos X de Rich y Crick (19), así como los de Ramachandran (20) (21) y de Cowan y McGavin (22), han mostrado que las cadenas  $\alpha$  forman cada una, hélices hacia la izquierda. Cada residuo da un giro de  $-120^\circ$  sobre su eje en una longitud aproximada de  $3 \text{ \AA}$  habiendo una translación de  $9 \text{ \AA}$  en cada vuelta. Esto implica que cada tercer residuo representa un giro completo, es decir de  $-360^\circ$ . A su vez, las tres cadenas  $\alpha$  se enrollan sobre un eje común formando una super hélice hacia la derecha, la cual se estabiliza por puentes de hidrógeno entre el grupo  $\text{NH}_2$  de la tercera unión peptídica y el grupo  $-\text{C}=\text{O}$  de la tercera unión peptídica de otra cadena adyacente. Por cada tres aminoácidos hay dos puentes de hidrógeno, habiendo también un puente de hidrógeno con el agua estructural de la proteína (23)

La colágena de la piel se puede extraer a  $4^\circ \text{ C}$  utilizando soluciones alcalinas débiles, ácidos débiles o bien soluciones de sales neutras. En estas condiciones, la colágena está nativa y mantiene su estructura helicoidal intacta. La colágena joven o recientemente sintetizada, se extrae fácilmente en soluciones de sales neutras y está formada casi exclusivamente por cadenas  $\alpha$  (8)

(24) (25). La colágena mas vieja, requiere para su extracción de soluciones ácidas débiles como soluciones amortiguadoras de citratos (26) o ácido acético 0.5M. En esta colágena puede haber hasta un 50% de componentes  $\beta$  y también se pueden encontrar componentes  $\gamma$ . Lo que queda después de estas extracciones es la llamada "Colágena Insoluble", que sólo se puede extraer con métodos drásticos como calentamiento con ácido tricloroacético a 90° C (27) (28) o bien con agentes desnaturalizantes como Urea y Guanidina (29).

La colágena extraída que queda en solución, puede regenerar las fibras nativas por diálisis contra iones fosfato (30). Si a la solución de tropocolágena se le adiciona ATP, las fibras precipitan en un nuevo tipo de estructura llamada SLS (segmentos de espaciamiento largo), en las cuales, las fibras se encuentran paralelas cabeza con cabeza y cola con cola. Otro arreglo puede hacerse adicionando Glicoproteínas, con lo que se forman otras estructuras llamadas FLS (fibras con espaciamiento largo), unidas las fibras alternadamente cabeza con cola (31). Todas estas estructuras son interconvertibles (32).

#### COMPOSICIÓN DE AMINOACIDOS.

Una característica química muy importante de la proteína es la abundancia del aminoácido Glicina (forma el 33% de los aminoácidos totales en colágena), así como la ausencia de triptofano y de Cisteína ( esta última solamente se ha encontrado en la colágena de Ascaris (33) , además, la presencia de hidroxiprolina, que-

aparte de colágena, se encuentra en muy pequeña proporción (alrededor del 1%) en Elastina (34) y en algunas plantas (*Helianthus tuberosus*, *Pisum sativum* y *Avena sativa*) (35) (36). La hidroxilisina, se encuentra en pequeña concentración y es exclusiva de la colágena.

Estos aminoácidos desempeñan un papel muy importante; la hidroxiprolina junto con la prolina, representan el 25% del total de aminoácidos. La presencia de hidroxiprolina se considera como indicio de colágena y su contenido, como medida de cuantificación de ésta. La hidroxilisina esta involucrada en la formación de enlaces intra e inter moleculares y es el sitio de unión de carbohidratos (37).

La estructura primaria de la colágena varía de especie a especie, sin embargo, conservan una característica común: la presencia de una zona Cristalina (no polar), en donde de cada tres aminoácidos se encuentra una glicina, seguida de una prolina formando así una secuencia repetida del tripeptido GLI-PRO-X, en donde X puede ser cualquier otro aminoácido, Frecuentemente se encuentra hidroxiprolina o alanina (38). Existe otra zona llamada Zona Amorfa (polar), en donde predominan los aminoácidos polares (39). Estas zonas se repiten a lo largo de la proteína, le confieren una estructura especial y son las responsables de la periodicidad característica de la colágena (40) (41), así como la zona cristalina es la responsable de la estructura helicoidal (42).

La existencia de la zona cristalina ha sido ampliamente con

firmada con el uso de colagenasa bacteriana\*, enzima que tiene como sustrato específico colágena o gelatina (43). Es específica para la secuencia PRO-X-GLI-PRO-Y rompiendo como se indica entre X y GLI (40) (43). La colágena (Ichtyocol) se rompe en aproximadamente 200 péptidos. La mayoría de los péptidos tienen glicina como amino terminal (45), prolina en segundo lugar y el tercer lugar varía según el tamaño. Los tripéptidos tienen generalmente hidroxiprolina o alanina (38), o bien otros aminoácidos aunque en mucho menor proporción (46). Los trabajos de Nagai y Noda (47) utilizando oligopéptidos sintéticos confirman la especificidad de la colagenasa. Los estudios realizados por Grassman (48) con otras enzimas proteolíticas como tripsina y quimotripsina, confirmaron la existencia de zonas polares en colágena. Aislaron péptidos pobres en iminoácidos que se podían separar de otros ricos en ellos. Estos estudios, junto con los de difracción de Rayos X y microscopía electrónica, confirman la existencia de ambas zonas: cristalina y amorfa en colágena (49)

La colágena presentaba serios problemas para estudiar su secuencia de aminoácidos ya que cada cadena está formada por aproximadamente 1000 aminoácidos. Si se fragmenta con enzimas proteolíticas o colagenasa, se obtiene un número elevado de péptidos, lo que dificulta su estudio.

\* La colagenasa utilizada se purificó de *Clostridium histolyticum*. Es estable a 37° C, tiene un pH óptimo entre 6 y 9 y requiere iones calcio para su actividad. Es inhibida por cisteína, EDTA y otros agentes quelantes, lo que sugiere que tenga un metal en su molécula (44).

Un método químico que abrió las puertas al estudio de la estructura primaria, es la ruptura con Bromuro de cianógeno (CNBr) reactivo que rompe la cadena peptídica a nivel de las metioninas y las transforma en homoserina o su lactona; por consiguiente, cada péptido tiene una homoserina o su lactona en la región carboxilo terminal (50) (51).

Hay de 5 a 9 metioninas en la colágena dependiendo de la especie animal y del sitio de su extracción. Cuando se incubaba con CNBr se rompe en un número discreto de péptidos (6 a 10) (52). Este método ha permitido estudiar la estructura primaria de las colágenas extraídas de piel de rata (53), piel de pollo (54) (55) y hueso de pollo (56) (57).

Cuando se incubaba  $\alpha 1$  de piel de rata (7 metioninas), se obtienen 8 péptidos, los cuales han sido separados por cromatografía en columnas de carboximetilcelulosa y fosfocelulosa (53). Se les ha denominado conforme emergen de la primera columna  $\alpha 1CB1$ ,  $\alpha 1CB2$ ,  $\alpha 1CB3$ , etc. (58) (La nomenclatura indica la cadena de la cual proviene el fragmento y el reactivo usado para romperlo).

A cada uno de los péptidos se les ha determinado su composición de aminoácidos (58), peso molecular (58) y el orden en que se encuentran en la cadena (59). Los resultados obtenidos por Piez y colaboradores se muestran en la Tabla I (7).

Recientemente se han caracterizado los péptidos obtenidos de la cadena  $\alpha 2$  de la colágena de piel de rata (60) y se conoce la secuencia de aminoácidos de  $\alpha 1CB1$ ,  $\alpha 1CB2$ , y  $\alpha 2CB1$  (61) (62).

TABLA I

ORDEN Y CARACTERISTICAS DE LOS PEPTIDOS OBTENIDOS CON CNBr  
SEPARADOS EN CARBOXIMETILCELULOSA (7).\*

PEPTIDO	RESIDUOS/PEPTIDO	PESO MOLECULAR**
α ICB1	15	1476
α ICB2	36	3311
α ICB4	46	4404
α ICB5	37	3525
α ICB8	266	24200
α ICB3	148	13500
α ICB7	266	24200
α ICB6	182	16600

El orden de los péptidos fue tomado de Piez (59).

\*\* Calculado por contenido de aminoácidos.



Estas secuencias se ilustran en la Figura I.

### ENLACES EN COLAGENA.

La colágena de la mayoría de las especies tiene uniones covalentes, las cuales son responsables de la formación de dímeros ( $\beta$ ) y trímeros ( $\gamma$ ). La ausencia de cisteínas y por lo tanto de puentes disulfuro, hace pensar en otro tipo de uniones químicas como las responsables de este proceso. Sólo se han encontrado enlaces disulfuro en la colágena de cutícula de *Ascaris* (63). En la colágena de la matriz de la dentina, se han postulado enlaces formados por ésteres de fosfato hasta en una proporción del 60% (64).

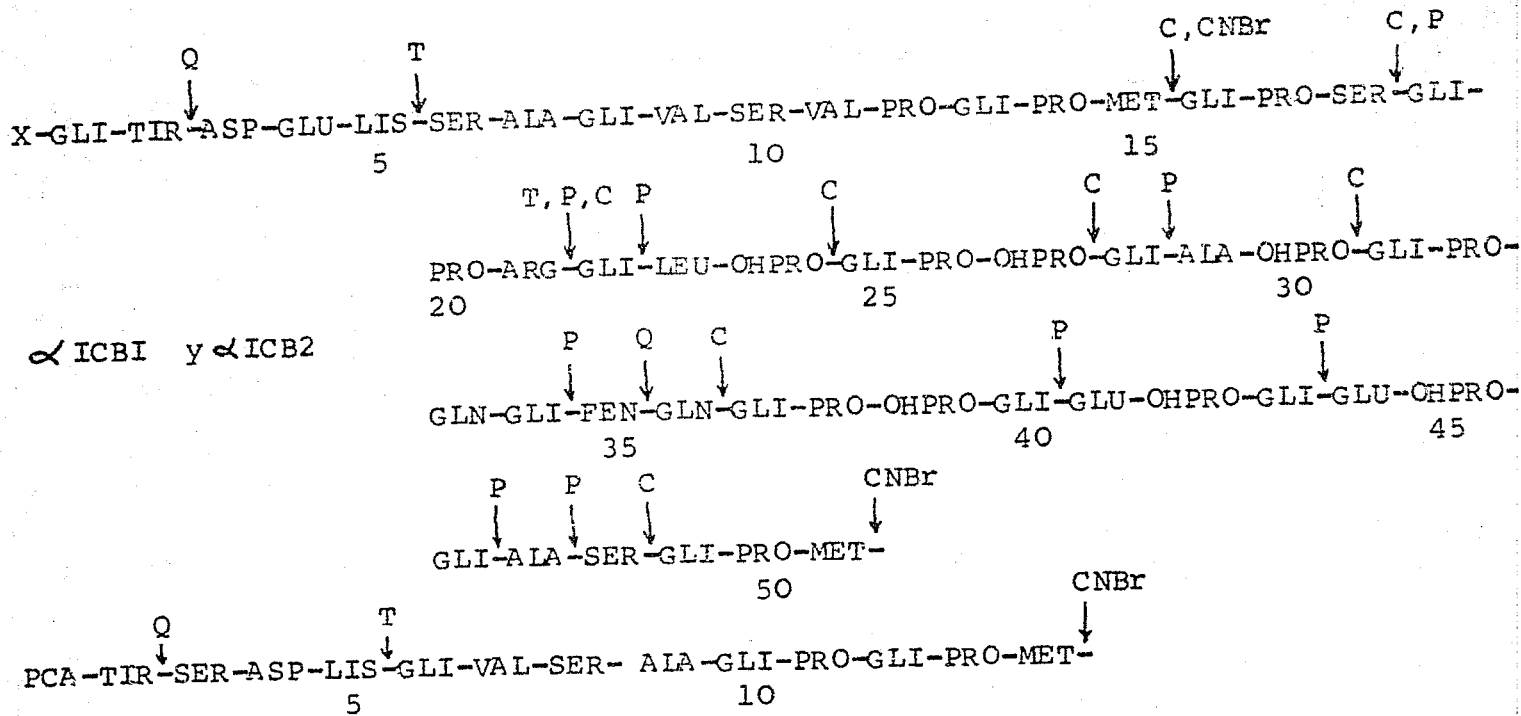
En una excelente revisión sobre las uniones poco comunes en colágena, Harding (65), discute ampliamente las uniones tipo Éster,  $\gamma$ -glutámico,  $\beta$ -aspártico, uniones glucosídicas, aldehidos, etc. como posibles enlaces intramoleculares, sin embargo, no presenta evidencia de ninguna de ellas.

En el año de 1954, (66) y posteriormente en 1958 (67), Landucci, demostró la presencia de grupos carbonilo libres en colágena. Años más tarde, Gustavson (68), demostró que pequeñas cantidades de aldehidos tienen un gran efecto sobre la estabilidad de la proteína.

En 1962, Levene (69) demostró que la colágena altamente purificada reaccionaba con la 2,4-dinitrofenilhidrazina para formar 2,4-dinitrofenilhidrazonas; sin embargo, colágena con trastornos en la formación de enlaces intra e intermoleculares (Latirismo), no--

FIGURA I

SECUENCIA DE AMINOACIDOS Y SITIO DE ACCION DE LAS ENZIMAS SOBRE LOS PEPTIDOS  $\alpha$  ICBI,  $\alpha$  ICB2  $\alpha$  2CBI DE COLAGENA DE PIEL DE RATA. (61) (62).



$\alpha$  2CBI

- Q = quimotripsina
- C = collagenasa
- T = tripsina
- P = pepsina
- PCA = ácido pirrolidón carboxílico

11

daba la reacción de la 2,4-dinitrofenilhidrazina y sugirió que la colágena tenía aldehidos y que estos estaban involucrados en la formación de los enlaces. Al mismo tiempo fueron encontrados grupos aldehidos en las colágenas de la vejiga natatoria de la carpa (Ichthyocol) y de la piel de Becerro (70).

Los aldehidos fueron tomando importancia y un año más tarde, Milch, (71), demostró que metabolitos conteniendo aldehidos producían en colágena cambios semejantes a los producidos con el envejecimiento. Gallop, en 1964 (72), sugirió que los carbonilos encontrados en colágena eran ceto ácidos o aldehidos  $\alpha$ - $\beta$  insaturados. Al mismo tiempo, Rojkind y colaboradores (73), incubaron colágena con 2,4-dinitrofenilhidrazina, la digirieron con colagenasa bacteriana y lograron aislar un péptido de 30 aminoácidos que contenía una 2,4 dinitrofenilhidrazona con espectro característico de aldehido  $\alpha$ - $\beta$  insaturado. Este péptido provenía de la región amino terminal y el aldehido se encontraba entre los primeros 7 aminoácidos de la cadena (74).

El origen y localización de los aldehidos se aclaró con los estudios de Bornstein y colaboradores (75) y Bornstein y Piez (76). Estos autores rompieron con CNBr cadenas purificadas  $\alpha$  y  $\beta$ . Separaron los péptidos por cromatografía en columnas de carboximetil celulosa y fosfoceululosa. En las cadenas  $\alpha$  encontraron que dos de los péptidos tenían 14 o 15 aminoácidos y una composición idéntica a excepción de un residuo; en uno de ellos se encontraba

una lisina en posición número 5 ( $\alpha$  CBl<sup>lis</sup>) y en el otro se encontraba un aldehído saturado ( $\alpha$  CBl<sup>ald</sup>) en lugar de lisina. En las cadenas  $\beta$  en lugar de estos péptidos se encontró un péptido-- de 30 aminoácidos con un aldehído  $\alpha$ - $\beta$  insaturado. Los estudios metabólicos realizados con lisina C<sup>14</sup>, demostraron que este aldehído provenía de la lisina, por probable desaminación oxidativa -- del grupo  $\epsilon$  - amino. La enzima responsable de esta desaminación-- fue demostrada dos años más tarde por Pinell y colaboradores (77), y el aldehído que se forma recibió el nombre de Allisina. La colágena obtenida de animales tratadas con  $\beta$  -amino propionitrilo contenía poco aldehído y los péptidos obtenidos por ruptura con CNBr-- mostraban la ausencia del péptido  $\alpha$  CBl<sup>ald</sup>.

Con estos datos se demostró que el péptido previamente aislado con Rojkind con la 2,4-dinitrofenilhidrazina (73) (74) y el obtenido por Bornstein (75) (76) era el mismo y se sugirió que el enlace intramolecular se formaba por una condensación aldólica de -- las Allisinas de dos cadenas vecinas.

Rojkind, Rhi y Aguirre (78) estudiaron la biosíntesis del aldehído  $\alpha$ - $\beta$  insaturado administrado Lisina C<sup>14</sup> y lisina tritiada en posiciones específicas. La actividad específica respecto a C<sup>14</sup>-- del péptido con el aldehído  $\alpha$ - $\beta$  insaturado, correspondía al doble de la encontrada para una lisina, lo cual sugería la presencia de-- dos compuestos derivados de este aminoácido. Por el porcentaje de-- pérdida de tritio se confirmó que se unían por medio de una conden

### sación aldólica.

Desde la época de Sócrates, se conocía que ciertos animales alimentados con una variedad de chícharos silvestres, presentaban alteraciones en el tejido conectivo. El principio activo de estos chícharos es el  $\beta$ -amino propionitrilo y la enfermedad que producen se denominó Latirismo ( por la variedad de chícharos *Lathyrus odoratus* y *Lathyrus sativus*). Se demostró que la enfermedad que producen se debe a la falta de formación de enlaces intra e inter moleculares (79) (80).

Gross, en 1963 (81), investigó a fondo los efectos de los Latirógenos sobre colágena comparándola con colágena normal. Encontró que tenía la misma composición de aminoácidos, carbohidratos, etc, sin embargo, la colágena latirítica se disolvía mucho más fácilmente en frío que la normal y mostraba pequeñas diferencias fisico-químicas. Por estos y otros estudios se concluyó que la acción de este agente, era a nivel de los enlaces intra e inter moleculares, ya sea rompiéndolos (82) o no dejando que se formen (79) (80) (81). Ziff (83), observó que el latirógeno sólo actúa sobre colágena que se está sintetizando y no tiene acción sobre la colágena ya formada. Se sugirió que el  $\beta$ -amino propionitrilo actuaba bloqueando los grupos aldehidos (84), sin embargo, más tarde se demostró que este agente actuaba inhibiendo la formación de la Alisina (77). Rojkind y Juárez (85) demostraron que la colágena latirítica producida por la administración de  $\beta$ -ami-

no propionitrilo y tiosemicarbazida, tenía sólo un 50% del contenido normal de aldehidos. Page y Benditt (86) (87) encontraron resultados semejantes y haciendo estudios con sustratos sintéticos, demostraron que el  $\beta$ -APN actúa inhibiendo competitivamente a una amino oxidasa inespecífica. Estos autores propusieron que el latirógeno actúa del mismo modo en la colágena, no dejando que se forme la Allisina. La presencia de una amino oxidasa específica para colágena ha sido demostrada en extracto de hueso por Pinell (77): (Esta enzima es dependiente de cobre y los animales con dieta pobre en cobre presentan un cuadro semejante al Latirismo (88) (89) (90).

Existe otro tipo de compuestos que producen Latirismo, como son las semicarbazidas y las tiosemicarbazidas (91). Estas pueden actuar bloqueando los grupos aldehido formando semicarbazonas (93) (94) o también inhibiendo a la enzima.

Grupos de compuestos que contienen un grupo Tiol (Penicilamina, Mercaptoetanolamina, Cisteína, etc.), producen en el animal experimental un cuadro semejante al Latirismo. La colágena es más soluble, contiene una proporción menor de cadenas  $\beta$  y sin embargo tiene un contenido normal de aldehidos. La colágena así extraída envejece más rápidamente que la normal cuando se incuba "In Vitro" utilizando el sistema de Gross (30). La colágena relativamente vieja, puede extraerse con los compuestos arriba mencionados cuando el tejido se incuba a pH neutro y 4°C. Esta colágena tiene-

un contenido normal de cadenas  $\beta$  y los aldehidos se encuentran -- normales o aumentados. A los pocos minutos de incubarla "In Vitro" a pH neutro y 37°C, se forma un gel altamente insoluble. Con todos estos datos se ha sugerido que la Penicilamina actúa combinándose o desplazando al aldehido para formar un compuesto más estable: las Tiazolidinas (95) (96) (97) (98). Pinell (77), ha demostrado que la Penicilamina no inhibe a la enzima, lo cual está de acuerdo con los datos de Nimni y su grupo (95, 96, 97, 98).

#### CARBOHIDRATOS EN COLAGENA.

Se ha encontrado que los carbohidratos presentes en algunas colágenas de vertebrados, son hexosas; específicamente D glucosa<sup>1</sup> y D-galactosa. Se encuentran unidos a la proteína por uniones glucosídicas a través del carbono 1 de la hexosa. En Ichthyocol hay 5 residuos de glucosa y 7 de galactosa por tropocolágena de 300 000 de peso molecular (99). El grupo donador del hidroxilo en la proteína es la hidroxilisina (37), pudiendo encontrarse las hexosas como mono o disacáridos (100).

#### GENERALIDADES SOBRE BIOSINTESIS.

La colágena se sintetiza en el Retículo endoplásmico de los Fibroblastos (101), sin embargo, parece ser que hay otro tipo de células no fibroblásticas que tienen la capacidad de sintetizar colágena, aunque en mucha menor proporción (102).

Se ha visto que administrando hidroxiprolina o hidroxilisina

radioactivas, no se incorporan a la colágena, sin embargo, cuando se administra prolina o lisina marcadas, se encuentra hidroxiprolina e hidroxilisina radioactivas (103). Esto sugirió que hay un precursor rico en prolina (104), y una enzima hidroxilante, que es la responsable de hidroxilar a la prolina y a la lisina (105). A este precursor se la ha denominado Protocolágena (28) y se ha logrado preparar utilizando  $\alpha, \alpha'$ -dipiridil, que es un inhibidor de la hidroxilasa (106). La hidroxilasa para su acción requiere ácido  $\alpha$  ceto glutárico, iones ferrosos, oxígeno molecular y la presencia de ácido ascórbico (107). Para que la enzima actúe necesita un sustrato de más de 2000 de peso molecular (108).

#### ASPECTOS INMUNOLOGICOS.

Por mucho tiempo se creía que la colágena tenía poco o ningún poder antigénico. Esto se atribuía a la falta de triptofano y al bajo contenido de aminoácidos aromáticos como tirosina y fenil alanina (109). Sin embargo, en 1953, Maurer (110) logró preparar anticuerpos contra gelatina obtenida de varias especies animales.

Se consideran responsables de la actividad antigénica de la colágena a los péptidos derivados de la región amino terminal (equivalente a CB1 y CB2), ya que tienen una de las tirosinas existentes en colágena (111).

#### OBJETO DE LA TESIS.

La finalidad del presente trabajo es aislar y determinar la



estructura del enlace intramolecular, al mismo tiempo de hacer un estudio comparativo entre dos especies diferentes como son la rata y el becerro.

M A T E R I A L

Las resinas para cromatografía que se utilizaron se obtuvieron de las siguientes casas comerciales: Carboximetilcelulosa-CM-52 de Whatman; DEAE-celulosa de Serva Entwicklungslabor, Heidelberg; Bio Gel y Fosfocelulosa de Bio-Rad; Sephadex G-25 de Pharmacia Fine Chemicals; 2,4-dinitro fenilhidrazina, Bromuro de cianogeno de Eastman Organic Chemicals; Borohidruro de sodio de Matheson, Coleman and Bell; Acido Cromotrópico de May & Baker; Ninhidrina de Pierce Chemical Company; Hidroxido de Hiamina, PPO-2,5-difeniloxazol y Dimetil-POPOP (1,4-bis-2 [4-metil-5-Feniloxazolil] benceno) de la casa Packard; Piridina, Tetra cloruro de carbono, Acido Formico y Meta periodato de sodio de J.T.Baker.

La colágenasa bacteriana fue obsequio del Dr. Sam Seifter del Instituto Albert Einstein de Nueva York.

Todos los reactivos utilizados fueron químicamente puros.

M E T O D O SPROCEDIMIENTO DE EXTRACCION DE COLAGENA SOLUBLE EN ACIDO. (Metodo de Gallop (26)).

Todo el proceso que se describe a continuación se realizó a 4°C. La piel de Becerro o de las Ratas recientemente sacrificadas, se rasura perfectamente y se elimina el tejido celular subcutáneo, músculo, etc. Se fragmenta finamente y se muele en un molino de carne. Aproximadamente 500 g de la piel molida se suspenden en dos litros de una solución de acetato de sodio 0.5M y se deja agitando toda la noche. Se filtra a través de una gasa, se deshecha el filtrado y se repite el proceso dos veces más. Se suspende de la piel en dos litros de agua destilada, se deja agitando toda la noche, se filtra a través de una gasa y se deshecha el filtrado. Se repite dos veces. Se suspende el sedimento en dos litros de una solución de citratos, la que contiene un litro de citrato de sodio 0.05M y un litro de ácido cítrico 0.1M, la solución queda con un pH de 4.3. Se agita toda la noche, se filtra a través de una gasa, se guarda el filtrado y se repite la extracción dos veces más. Se juntan los filtrados y se centrifugan a 20 000 x g durante 60 mins. en una centrifuga MSE-40. Se dializa el sobrenadante contra una solución de fosfatos 0.02M hasta que las fibras de colágena precipitan. Se centrifuga, se lava el sedimento tres ve-

ces con agua destilada y se disuelve en ácido acético 0.25M. El material así obtenido puede liofilizarse o guardarse congelado.

SEPARACION DE CADENAS  $\alpha$  Y  $\beta$  EN CARBOXIMETILCELULOSA. (Método de Piez (24)).

Se prepara la carboximetilcelulosa (CM-celulosa) por el método de Peterson y Sober (112). Se suspende en una solución amortiguadora de acetato de sodio 0.06M pH 4.8 y se empaca la resina en una columna de cromatografía de 2.5 X 18 cm con un flujo de 180 ml/hora. La columna se mantiene a temperatura constante de 40°C.

Se disuelven 100 mg de colágena en 50 ml de solución amortiguadora de acetato de sodio 0.06M pH 4.8 y se desnaturaliza la proteína calentando a 60°C por 30 mins. Se aplica la muestra en la columna y se eluye con un gradiente lineal de NaCl de 0.0 a 0.1M en la solución amortiguadora de acetato de sodio, en un volumen total de 800 ml. Se colectan fracciones de 8 ml a una velocidad de 180 ml/hora. La proteína se determina leyendo a 230 m $\mu$  en un Espectrofotómetro Zeiss.

OBTENCION DEL PEPTIDO CON EL ALDEHIDO  $\alpha$ - $\beta$  INSATURADO.

FORMACION DE 2,4-DINITRO FENILHIDRAZONA CON EL ALDEHIDO  $\alpha$ - $\beta$  INSATURADO. (Método de Roikind (73) (74))

A una solución al 1% de colágena desnaturalizada por calor, se le agregan 2 ml de una solución de 2, 4-dinitrofenilhidrazina

al 0.2% en HCl 2N. Se ajusta el pH a 3 y se deja agitando 30 mins. a temperatura ambiente. La reacción se termina por diálisis con - tra varios cambios de agua destilada durante 24 horas.

El espectro de absorción del derivado formado se determinó utilizando un Espectrofotómetro Beckman D.B. La concentración de aldehído se determinó usando un coeficiente de extinción molar de  $20 \times 10^3$  a 394 m $\mu$  (74).

La colágena marcada con la 2,4-dinitrofenilhidrazina se ha ce 0.005M con cloruro de calcio, se ajusta a pH 8.5 con NaOH 1N y se agregan 100% de colagenasa bacteriana purificada por cada 2g - de colágena. Se mantiene el pH constante en 8.5 hasta que ya no - haya variación y posteriormente se incuba a 40°C durante 24 horas.

La mezcla de péptidos se aplica en una columna de 2.5 X 20 cm de DEAE celulosa equilibrada con solución amortiguadora de -- Tris-HCl (tris-hidroxi metilaminoetano) 0.05M pH 8.3. La muestra - se eluye con 300 ml de la solución 0.05M de tris-HCl pH 8.3 y pos - teriormente con un gradiente lineal de NaCl de 0.0 a 1M en un vo - lumen total de 600 ml. Se colectan fracciones de 8 ml a una velo - cidad de 180 ml/hora y se determina la absorbancia a 230, 280 y - 390 m $\mu$ .

Los picos se desalifican en una columna de 2 X 50 cm de -- Bio-Gel P-2 equilibrado con ácido acético 0.25M. La muestra desa - lificada se evapora a sequedad en un evaporador rotatorio y se di - suelve en un volumen pequeño de agua destilada.

Alícuotas de 1 ml se aplican en el centro de tiras de papel Whatman 3 MM de 20 cm de ancho por 82 cm de largo. El papel se humedece con solución amortiguadora de Piridina-Acetato 0.1M- pH 4, se seca el exceso de buffer con papel filtro y se somete a electroforesis de alto voltaje en un aparato Savant. Se utiliza la misma solución amortiguadora y se pasa una corriente de 24.4 voltios/cm por 90 minutos. Se saca el papel y se deja secar en una campana de extracción. Se corta una tira de un centímetro de ancho a todo lo largo se humedece en una solución de Ninhidrina al 1% en acetona y se desarrolla el color calentando en un horno a 100°C durante 5 mins. La zona que contiene la 2,4-dinitrofenilhidrazona (de color amarillo), se corta en pequeños fragmentos y se deja agitando toda la noche con agua destilada, se filtra y concentra a un volumen final de 1 ml.

REDUCCION CON BOROTRITIO DEL ALDEHIDO  $\alpha$  -  $\beta$  INSATURADO.

Se ajusta la solución de colágena a pH 8, se agrega un exceso de 200 molas de borohidruro de sodio tritiado calibrado por el método de Gallop\* (113). Se deja agitando durante una hora

-----

\*Se reduce el ácido  $\delta$  aminolevulínico, se forma el dinitro-fenol-derivado, se purifica y se mide la radioactividad. La actividad-específica se saca utilizando un coeficiente de extinción molar de 16 000 (para los DNP derivados). El ácido  $\delta$  aminolevulinico, al igual que el aldehido  $\alpha$ -insaturado acepta una molécula de tritio en su estructura.

manteniendo el pH entre 8 y 9. Se para la reacción bajando el pH a 3 con ácido acético o ácido clorhídrico. Se dializa contra agua destilada o se liofiliza varias veces hasta obtener una actividad específica constante. A pesar de liofilizar varias veces, la proteína puede contener hasta un 20 a 25% de agua que es muy difícil de eliminar.

La actividad específica se expresa en dpm/mg de proteína determinada por el método de la hidroxiprolina (114).

La radioactividad se determina poniendo 0.05 ml de la muestra y 0.5 ml de Hidróxido de Hiamina (1 molar en metanol), en frascos de conteo conteniendo 15 ml de líquido de centelleo de la siguiente composición: 4g de PPO (2,5-difeniloxazol) y 100 mg de Dimetil POPOP (1,4-bis-2, [4-metil-5-feniloxazolil] benceno), en un litro de tolueno. Las muestras se contaron en un aparato Packard Tri-Carb. La proteína marcada se liofiliza, se disuelve en ácido fórmico al 70%, se agrega 100 molas de exceso de Bromuro de cianógeno (CNBr) en relación al número de metioninas y se incuba a 40°C durante 4 horas. La reacción se para al diluir 10 veces con agua y se liofiliza para eliminar el exceso de reactivo (53). Se disuelve en solución amortiguadora de citrato de sodio 0.02M pH 3.6 y se aplica a una columna de 2.5 X 18 cm mantenida a 40°C que contiene CM-celulosa equilibrada con la misma solución amortiguadora. La muestra se eluye con un gradiente lineal de NaCl de 0.04 a 0.14M en solución de citrato de sodio

0.02M pH 3.6, en un volumen total de 1600 ml (58). Se colectan fracciones de 8 ml con un flujo de 160 ml/hora. La proteína se determina a 230 m $\mu$ . Los picos obtenidos se desalifican en columnas de Bio-Gel P-2 por el método ya descrito.

El pico conteniendo la radioactividad se aplica a una columna de 2.5 X 18 cm de Fosfocelulosa mantenida a 40°C. La muestra se eluye utilizando el método de Bornstein y colaboradores (75), con solución amortiguadora de acetato de sodio 0.001M pH 3.8, con un gradiente lineal de NaCl de 0.0 a 0.3M en un volumen total de 820 ml. Se colectan fracciones de 8 ml con una velocidad de 140 ml/hora. La proteína se detecta por su absorción a 230 m $\mu$ .

El pico conteniendo la mayor parte de la radioactividad se desalifica en una columna de 1 X 100 cm de Sephadex G-25 (mediano) eluyendo con ácido acético 0.25M. Se purifica por electroforesis en alto voltaje. El pico se localiza cortando tiras de 2 X 1 cm que se aplican en frascos de conteo con 10 ml de líquido de centelleo.

#### ANALISIS DE AMINOACIDOS

La muestra por analizar se coloca en ampollitas de vidrio, se le agrega un volumen igual de HCl 12N y se cierran al vacío. Se hidrolizan durante 24 horas en un horno a 104°C. El clorhídrico se evapora bajo presión reducida y la muestra se



disuelve en un volumen pequeño de agua destilada.

La composición de aminoácidos se determina en un Analizador de aminoácidos Beckman / Spinco 120, utilizando la técnica-acelerada de Spackman, Moore y Stein (115).

#### DEMOSTRACIÓN DEL DOBLE ENLACE

##### A) OXIDACION CON OZONO

La colágena liofilizada se corta finamente y se suspende en un volumen adecuado de  $\text{CCl}_4$ . Se adapta a un generador de Ozono dejando que burbujee por un período de una hora. Se centrifuga, se deshecha el sobrenadante y la colágena se disuelve en -- agua destilada conteniendo borotritio con el fin de reducir los peróxidos y aldehidos formados. La muestra se dializa para eliminar el exceso de borotritio.

##### B) OXIDACION CON ACIDO PERFORMICO (116).

La colágena liofilizada se disuelve en un pequeño volumen de ácido fórmico al 90%. Se enfría la muestra a  $-5^\circ\text{C}$  y se agrega el ácido perfo<sup>o</sup>rmico\*, se deja a esta temperatura durante dos horas, se diluye 10 veces el volumen con agua destilada y se --

---

\* Se prepara con 5 volúmenes de peróxido de hidrógeno al 30% y 95 volúmenes de ácido fórmico al 90% y se mantiene en envase cerrado a temperatura ambiente durante dos horas. Antes de agregarlo a la muestra se enfría a  $-5^\circ\text{C}$ . Se prepara cada vez que se va a utilizar.

liofiliza para eliminar los reactivos.

### C) OXIDACION CON PERIODATO

Se calibró el método con colágena, utilizando diferentes concentraciones de meta-periodato de sodio a diferentes tiempos y midiendo el formaldehído liberado usando la técnica del ácido Cromotropico (117).

Se ajusta la solución de colágena a pH entre 5 y 7, se agrega una solución de meta-periodato de sodio 0.02N (20  $\mu$ molas por mg de proteína), se deja agitando por una hora en la oscuridad. La reacción se para agregando glucosa para que se termine de consumir el periodato o bien quitando el exceso de periodato agitándolo con Dowex 1-X8 (200-400 mallas) y filtrando. Cuando se utilizó material radioactivo, se midió la radioactividad antes y después de oxidar, evaporando la muestra varias veces para eliminar el tritio liberado y así poder determinar el porcentaje de pérdida de radioactividad. Alícuotas de las muestras tratadas con estos procedimientos de oxidación se sometieron a electroferesis en gel de acrilamida por el método de Nagai y colaboradores (118), los geles se tiñen con amido de Schwarz por 5 mins. y se decolora con ácido acético al 7%. Con este método se puede ver la relación de  $\alpha$  y  $\beta$  y determinar la ruptura de la doble ligadura previamente hidratada con ácido per fórmico. El porcentaje relativo de  $\alpha$  y  $\beta$  se determina en un Densitómetro Densicord.

AISLAMIENTO DEL PRODUCTO DE REDUCCION DE LA CONDENSACION ALDOLICA.

La colágena total o el péptido puro, se sometieron a hidrólisis alcalina con NaOH 2N en ampolletas cerradas al vacío durante 24 horas en un horno a 104°C. Se neutraliza el hidrolizado con HCl 2N, se evapora a sequedad y se disuelve en un pequeño volumen de agua destilada. Se aplica la muestra en la columna larga del Analizador de aminoácidos, el cual tiene adaptado un colector de fracciones. Se colectan fracciones de 1 ml, se determina la presencia de los aminoácidos por el método de la Ninhidrina (119) y el resto se utiliza para determinar la radioactividad.

Los picos conteniendo radioactividad se concentraron, se ajusta el pH a 1 con HCl y se lleva a un volumen de 10 ml. Toda la muestra se aplica a una columna de 1.2 x 8 cm de Dowex 50-X4, eluyendo la sal con 15 ml de agua destilada y recuperando la muestra con 15 ml de amoníaco 3 N.

Una alícuota de la muestra desalificada se pone en papel-Whatman 3 MM para hacer una cromatografía descendente en Butanol:acético:agua (4:1:1). Se revela el cromatograma con ninhidrina y se localiza la radioactividad en un duplicado, contando en el papel directamente y así poder determinar el Rf de las muestras.

## RESULTADOS Y DISCUSION

La colágena obtenida se separa en cadenas  $\alpha$  y  $\beta$ . En la Gráfica I, se muestra el perfil de elución obtenido con colágena de Becerro. El primer pico que aparece corresponde a las cadenas  $\alpha 1$  y al dímero  $\beta 11$ , que no se puede separar por tener la misma carga neta. El segundo pico corresponde al dímero  $\beta 12$ , que se encuentra en mayor proporción y no se resuelve completamente del monómero  $\alpha 2$ , que sale a continuación. El último componente corresponde a agregados de mayor peso molecular, los cuales se eluyen con mayor fuerza iónica o con NaOH.

La gráfica II corresponde a la separación de colágena de Rata. El orden de elución es el mismo, sin embargo, se obtiene una mayor resolución que en el caso de la colágena de Becerro. La proporción de cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  es aproximadamente del 50%.

Se toman los dímeros de ambas especies, se dializan, se forma la 2,4-dinitrofenilhidrazona y se digieren con Colagena-sa bacteriana. Los péptidos obtenidos se separan en columnas de DEAE-celulosa. En las gráficas III y IV, se muestran los patrones de elución de colágena de Becerro y Rata respectivamente. Con el volumen de exclusión de la columna aparece un pico grande el cual tiene la mayor absorción a 230 m $\mu$ . (región donde absorbe la proteína). Este pico representa el 80% de la proteína total y tiene un poco de absorción a 280 m $\mu$ . que es la re-

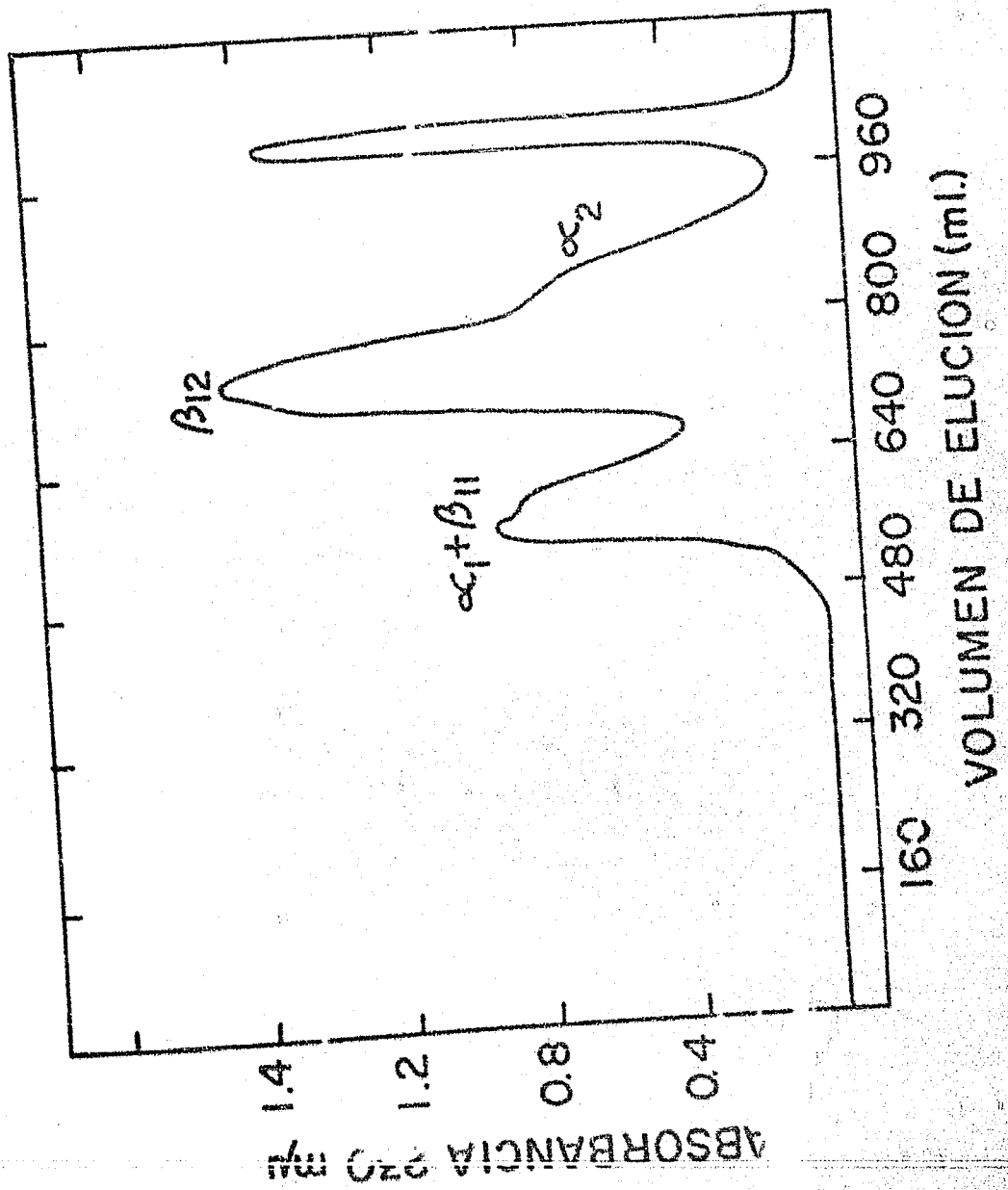
GRAFICA I.

Colágena de Becerro. Cromatografía en CM-celulosa.

La muestra se eluye con acetato de sodio 0.06M pH

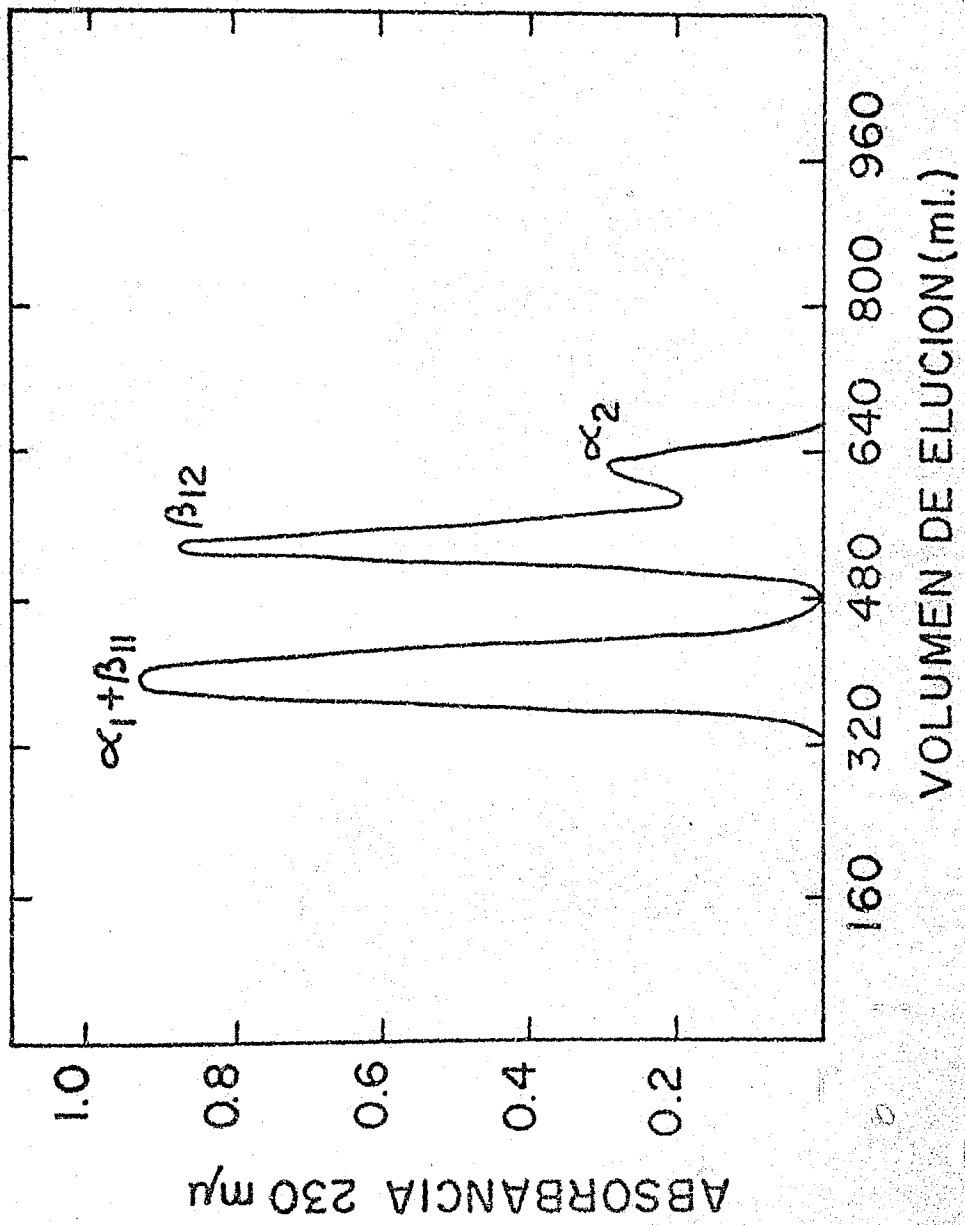
4.8 con un gradiente lineal de NaCl de 0.0 a 0.1M.

Volumen total de 1000 ml.



GRAFICA II.

Colágena de Rata. Cromatografía en CM-celulosa. La muestra se eluye con acetato de sodio 0.06M pH 4.8 con un gradiente lineal de NaCl de 0.0 a 0.1M. Volumen total de 800 ml.

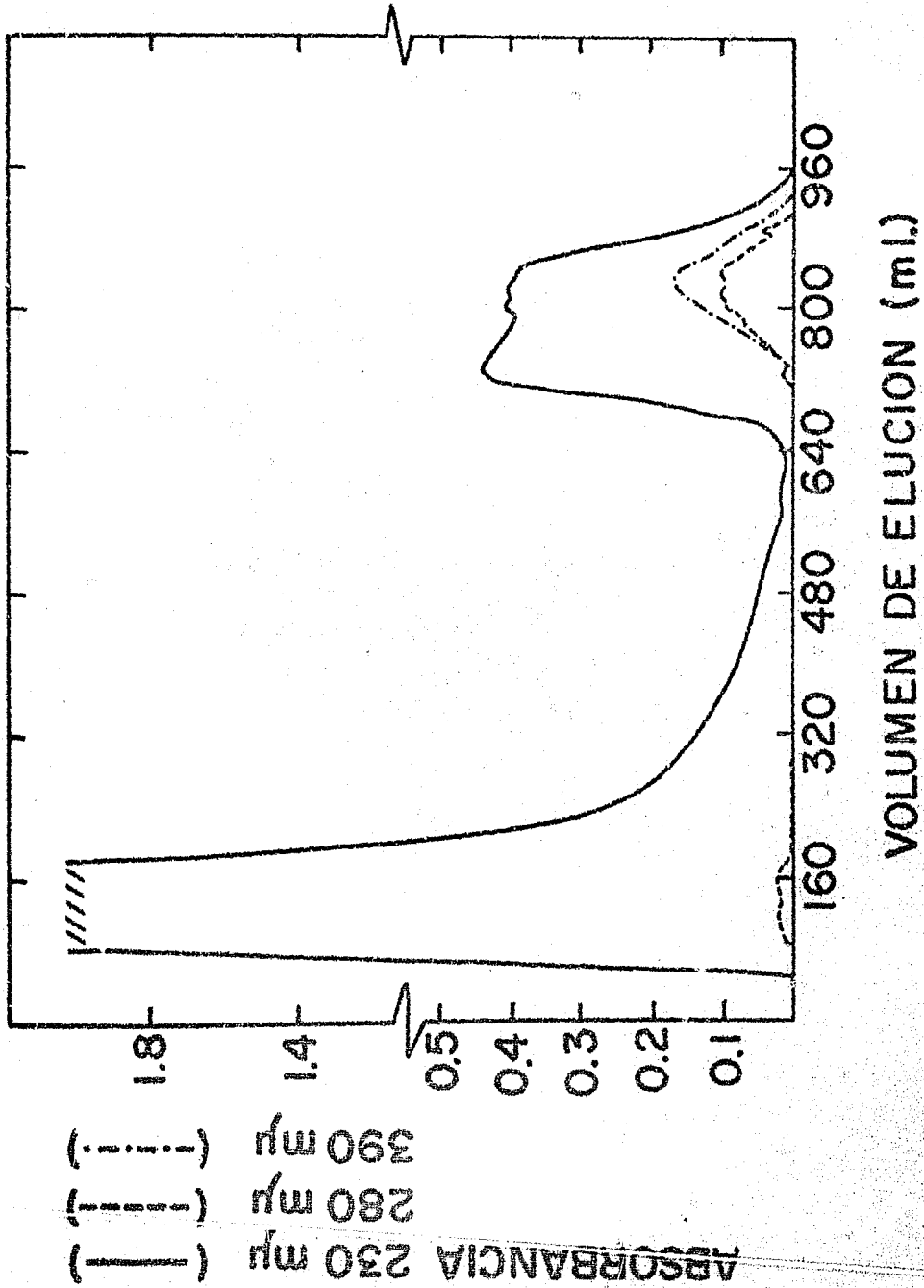




GRAFICA III.

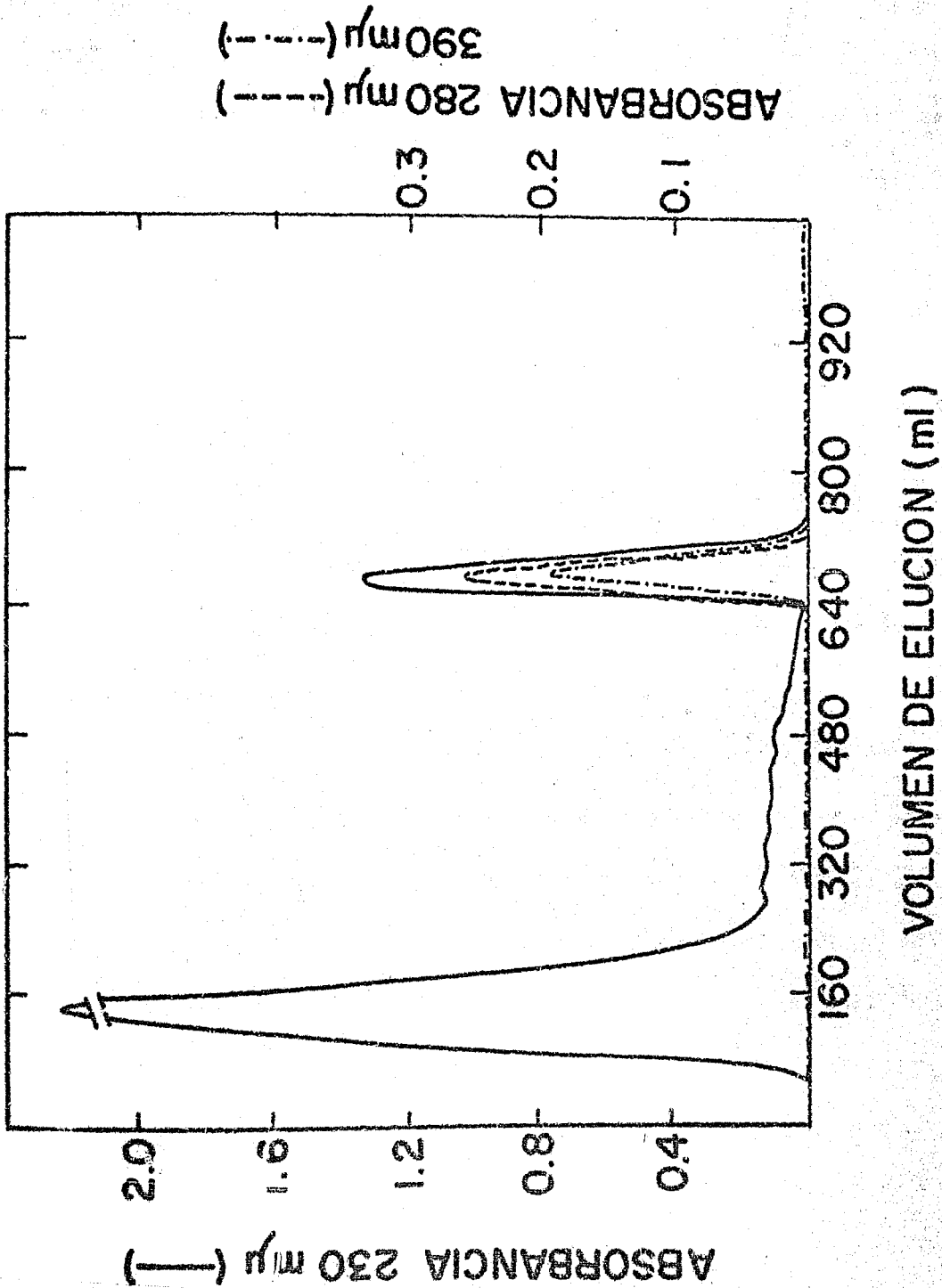
Cadenas  $\beta$  12 de Becerro. Cromatografía en DEAE-celulosa.

La muestra se eluye con 300 ml de solución de Tris-HCl --  
0.05M pH 8.3 y posteriormente con un gradiente lineal de-  
NaCl de 0.0 a 1.0M en un volumen total de 600 ml.



GRAFICA IV.

Cadenas  $\beta$  li de Rata. Cromatografia en DEAE-celulosa.  
La muestra se eluye con 300 ml de solución amortiguado  
ra de Tris-HCl 0.05M pH 8.3 y posteriormente con un --  
gradiente lineal de NaCl de 0.0 a 1.0M en un volumen --  
total de 600 ml.



gión donde absorben los aminoácidos aromáticos. En este pico se encuentran los carbohidratos y los tripéptidos de la zona cristalina que se obtienen con colagenasa. El último pico -- que aparece, contiene la mayor absorción a 280 m $\mu$  (aminoácidos aromáticos) y toda la absorción a 390 m $\mu$ , región que -- corresponde a la longitud de onda máxima de la 2,4-dinitrofenilhidrazona del aldehído  $\alpha$  -  $\beta$  insaturado. Este pico comprende -- al péptido obtenido de la región N-terminal por Rojkind y colaboradores (74).

El péptido se pasa por una columna de Bio-Gel P-2 para -- eliminar las sales y los contaminantes de pequeño peso molecular. Se purifica por electroforesis, en donde aparece como una banda amarilla que migra aproximadamente 3 cm hacia el ánodo. Esta banda no da reacción positiva con la ninhidrina, -- indicando que el péptido está puro y proviene de la región N-terminal de la proteína (74), ya que los grupos N-terminal de la colágena se encuentran bloqueados (120).

La composición de aminoácidos de los péptidos obtenidos -- de las cadenas  $\beta$  11 y  $\beta$  12, tanto de Rata como de Becerro, -- se muestran en la Tabla II. Entre las características principales del péptido de Rata está la ausencia de hidroxiprolina y un porcentaje bajo de glicina (21%), lo que hace pensar que estos péptidos no derivan de las zonas cristalinas de la proteína. Además,

TABLA II.

COMPOSICION DE AMINOACIDOS DEL PEPTIDO CONTENIENDO EL ENLACE  
INTRAMOLECULAR.

AMINOACIDO	RESIDUOS POR PEPTIDO							
	RATA				BECERRO			
	$\beta 11$		$\beta 12$		$\beta 11 + \alpha 1$		$\beta 12$	
	col.	*CNBr	Col.	*CNBr	Col.	CNBr	Col.	CNBr
hidroxiprolina	0	0	0	0	0	2	0	0
ácido aspártico	2	2	2	2	2	2	2	3
treonina	0	0	0	0	1	1	1	1
serina	4	4	4	4	5	5	3	4
ac. glutámico	2	2	2	2	5	4	3	4
prolina	4	4	4	4	3	6	4	6
glicina	6	6	6	6	10	11	7	11
alanina	2	2	2	2	3	2	1	2
valina	4	4	3	3	2	2	2	3
metionina	2	0	2	0	-	0	1	0
isoleucina	0	0	0	0	1	1	1	1
leucina	0	0	0	0	1	1	1	1
tirosina	2	2	2	2	-	1	1	2
fenil alanina	0	0	0	0	-	.4	1	1
homoserina	0	2	0	2	0	2	0	2

- NO SE DETERMINO

\* TOMADOS DE LOS TRABAJOS DE PIEZ.

sugieren que los péptidos no muestran estructura helicoidal característica de la colágena. Los estudios de Schmitt (111) con enzimas proteolíticas y los de Bornstein (121), utilizando CNBr en condiciones especiales, demuestran que estos péptidos están expuestos y son fácilmente liberados de la proteína, mientras que el resto de la estructura se mantiene intacto. Como se observa en la Tabla II, la composición de aminoácidos de ambos péptidos obtenidos por colagenasa es idéntica a la obtenida con CNBr (7). Estos resultados indican claramente que la metionina presente en este péptido es el sitio de ruptura tanto por el método enzimático como por el químico y que representa el paso de una zona polar a una cristalina ( ver Figura I ).

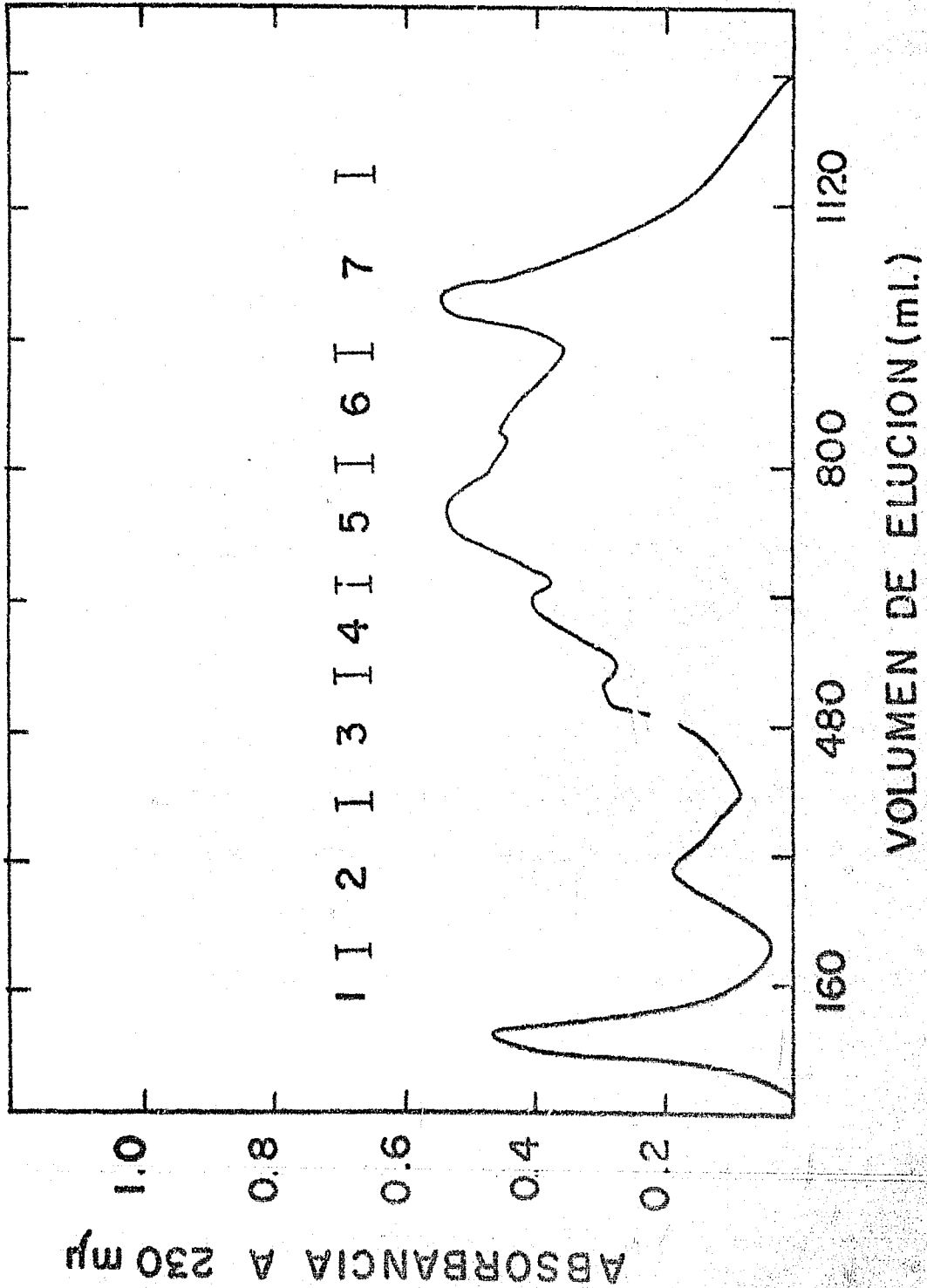
Los péptidos de piel de Becarro obtenidos por digestión enzimática (colagenasa) se muestran en la Tabla II. Se observan varias semejanzas con los péptidos de piel de Rata, ya que no muestran hidroxiprolina ni residuos básicos. Sin embargo, hay algunas diferencias que podrían considerarse como diferencias de especie. En estos péptidos se observa la presencia de fenil alanina, leucina e isoleucina.

Un lote de colágena de Becarro reducido con Borotritio se digirió con CNBr y los péptidos con el aldehído  $\alpha$ -~~9~~ insaturado ~~se verificaron~~ como se describió en los métodos. En la Gráfica V se muestra un patrón de elución representativo de la sa-

GRAFICA V.

Colágena total de Becerro. Cromatografía en CM-celulosa.  
La muestra se eluye con citrato de sodio 0.02M pH 3.6 --  
con un gradiente lineal de 0.04 a 0.14 de NaCl en un vo-  
lumen total de 1500 ml.





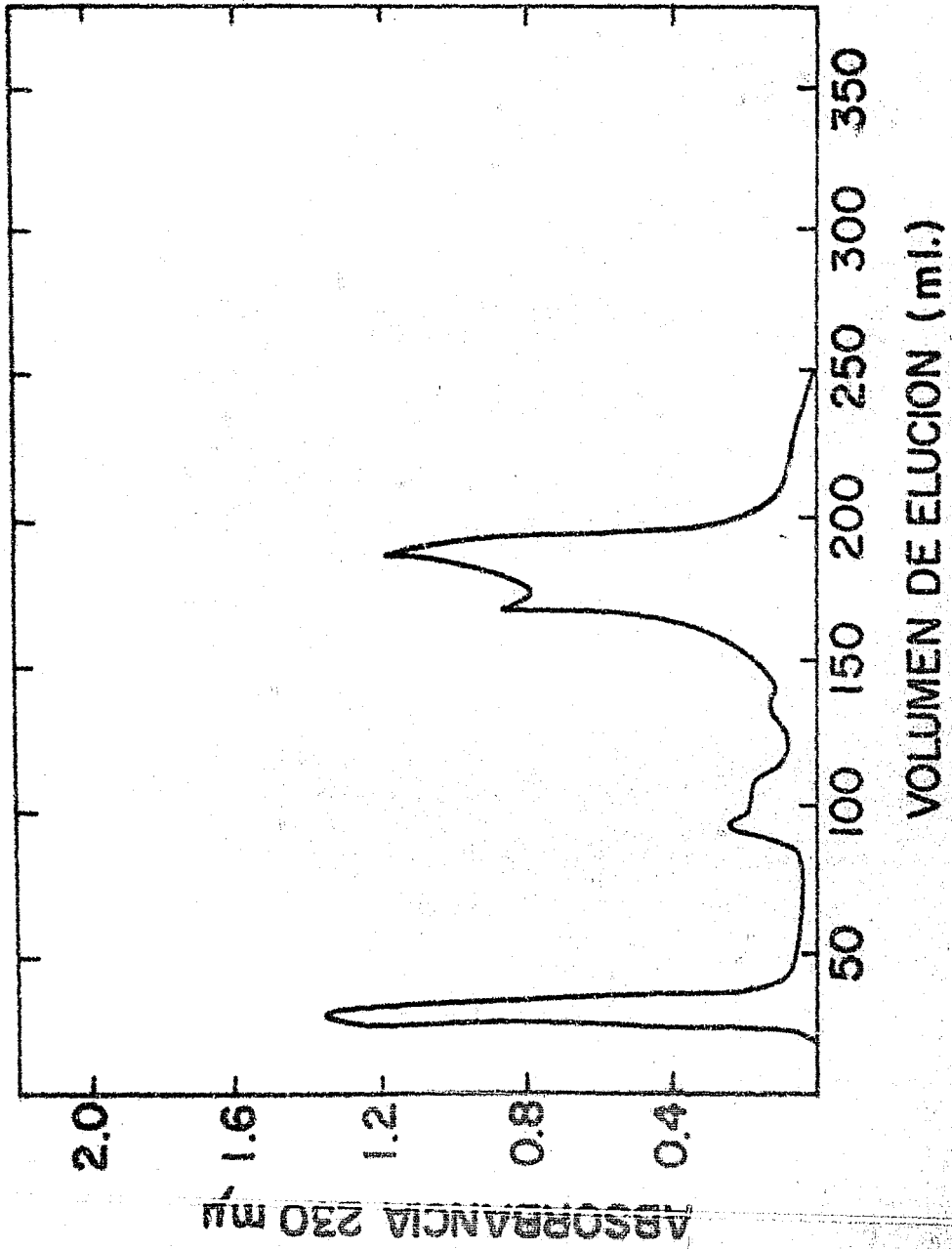
paración de estos péptidos. El primer pico que aparece contiene el 90% de las cuentas totales quedando el 20% faltante distribuido en el resto de la proteína. Este pico se desalifica y cromatografía nuevamente en columnas de Fosfocelulosa, en donde se obtiene una mayor resolución. Como se observa en la Gráfica VI, aparecen cuatro picos; el primero con la mayor parte de la radioactividad, se pasó por Sephadex G-25 como se ve en la Gráfica VII. Nuevamente se obtuvieron dos picos, uno pequeño que sale primero y que contiene el 62% de la radioactividad y el segundo pico, de menor peso molecular, con el resto de la radioactividad. La aparición de radioactividad en ambos picos y el sitio de elución, sugieren que el primer pico corresponde a los dímeros con el aldehído  $\alpha$ - $\beta$  insaturado reducido y el segundo pico a los monómeros con el aldehído saturado reducido. Para mayor purificación, se sometió el primer pico a electroforesis de alto voltaje, localizando el péptido por su radioactividad. Como se muestra en la gráfica VIII, el péptido migra dos centímetros hacia el ánodo.

Este mismo procedimiento, pero eliminando la cromatografía en Fosfocelulosa, se usó para purificar los péptidos de las cadenas  $\beta_{11} + \alpha_1$  y  $\beta_{12}$ , previamente separadas en CM-celulosa y después rotas con CNBr. Su composición se muestra en la Tabla II.

Como se observa, hay diferencias en el número total y tipo de aminoácidos. Encontrados en los péptidos obtenidos por colagena-

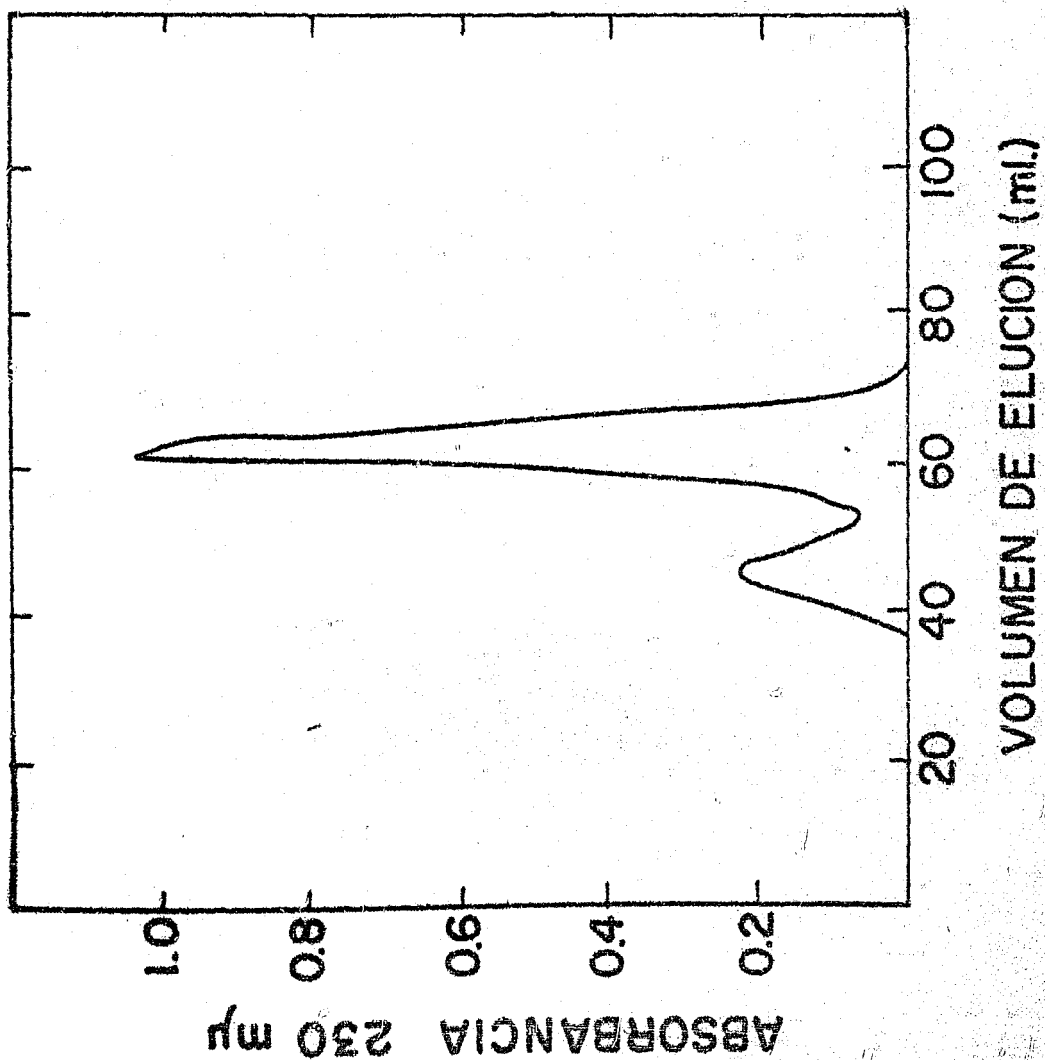
GRAFICA VI.

Primer péptido obtenido de la cromatografía anterior.  
Cromatografía en Fosfocelulosa. La muestra se eluye -  
con acetato de sodio 0.001M pH 3.8 con un gradiente -  
lineal de NaCl de 0.0 a 0.3M en un volumen total de -  
820 ml.



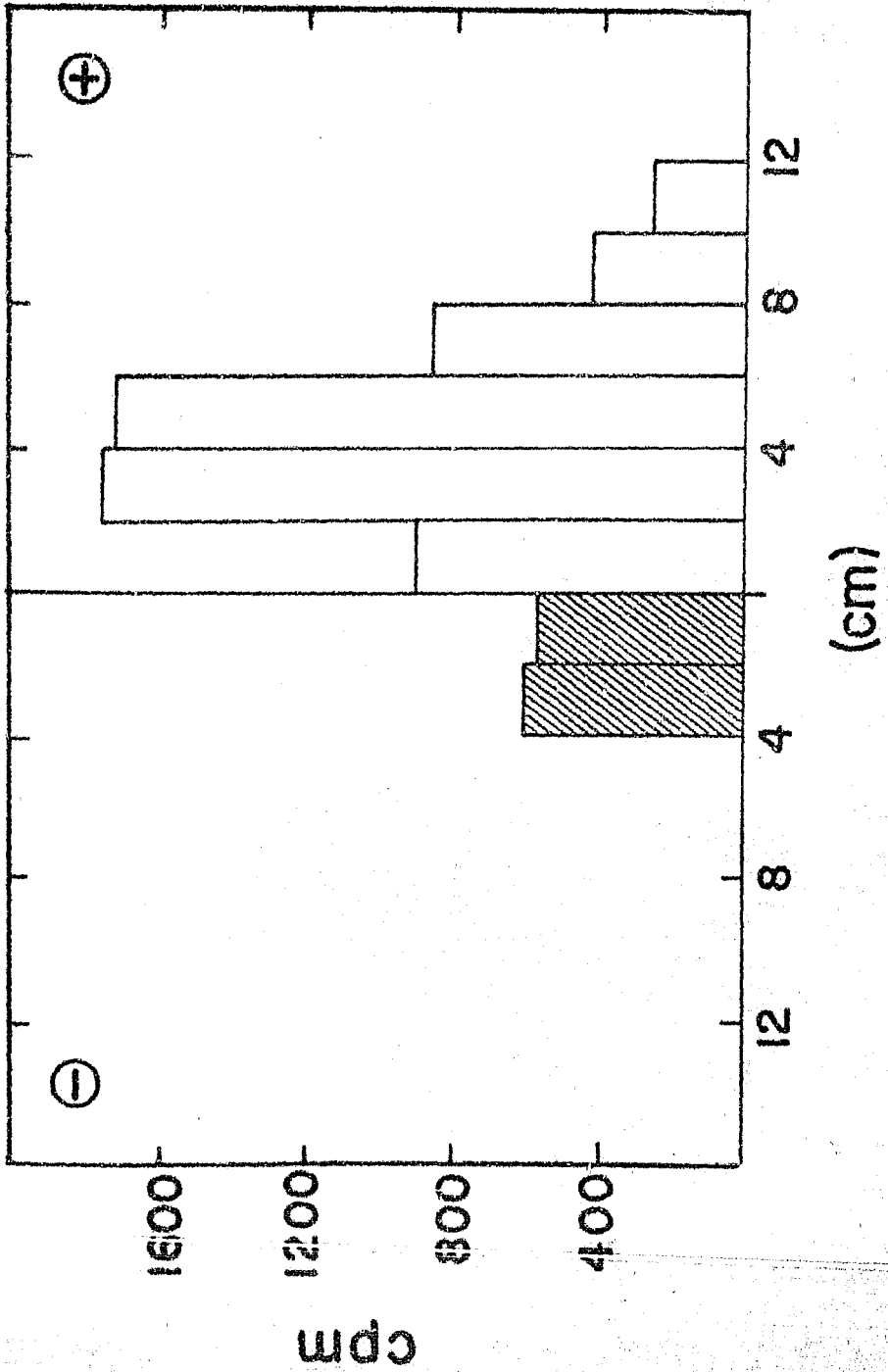
G R A F I C A VII.

Primer pico obtenido de Fosfocelulosa. Cromatografía en  
Sephadex G-25. La muestra se eluye con ácido acético --  
0.25M.



G R A F I C A      V I I I .

Electroforesis en alto voltaje. Solución amortiguadora de piridina-acetato 0.1M pH 4. Se hace pasar una corriente de 24.5 voltios/cm<sup>2</sup>. durante 90 minutos. El péptido se localiza por la radioactividad. Las barras sombreadas representan fracciones radioactivas con reacción positiva a la ninhidrina.





sa o CNBr. Hay un número mayor de residuos en los obtenidos con CNBr, lo que indica probablemente que la metionina no se encuentra en el décimoquinto lugar sino que aún más lejos. Esto podría explicar además la aparición de hidroxiprolina en algunos casos. El mayor número de residuos de prolina y glicina también pueden explicarse de esta manera.

#### AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DEL ENLACE INTRAMOLECULAR.

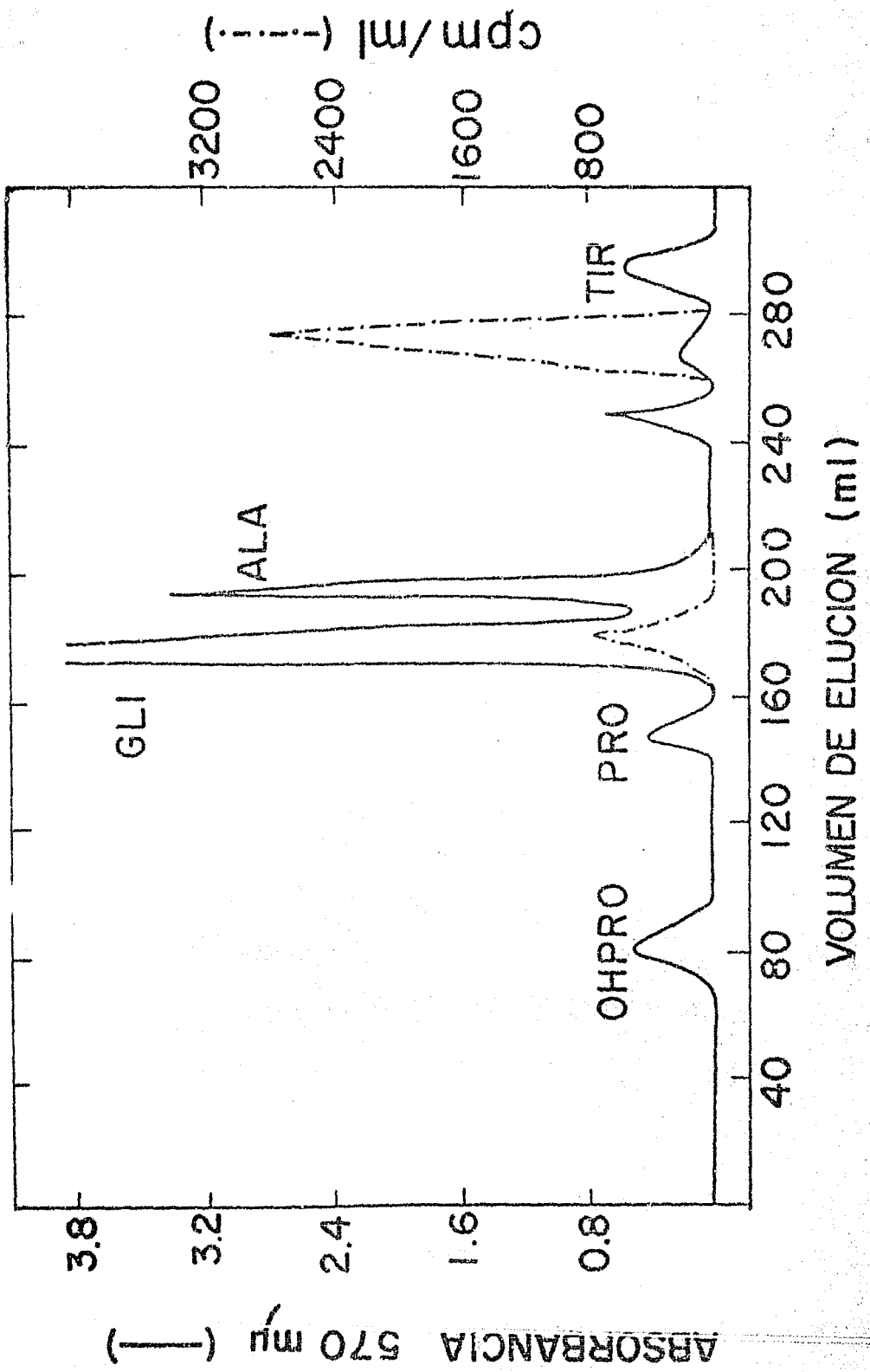
Para aislar el aldehído  $\alpha$ - $\beta$  insaturado de colágena de Rata, se utilizó el Analizador de aminoácidos. En la Gráfica IX se muestra el sitio donde aparece el aldehído obtenido por hidrólisis alcalina y localizado por su radiactividad.

El primer pico radiactivo que aparece junto con glicina, ha sido caracterizado como el producto de reducción del aldehído saturado (el  $\delta$  semialdehído del ácido  $\alpha$  amino adípico), al que se le ha denominado Hidroxinorleucina. El segundo pico, con mayor radiactividad, aparece después de valina y antes de tirosina y corresponde al producto de reducción del aldehído  $\alpha$ - $\beta$  insaturado, al que se ha denominado Aldol, por provenir de la condensación aldólica de dos  $\delta$  semialdehídos del ácido  $\alpha$  amino adípico (78).

Este Aldol es el mismo compuesto encontrado por Franzblau en Elastina (34) y el cual ha sido caracterizado por su Espec---

GRAFICA IX.

Hidrolizado alcalino del péptido puro de colágena de Rata  
conteniendo el aldehido  $\alpha - \beta$  insaturado. Cromatogra--  
fia en la columna larga del analizador de aminoácidos. La  
muestra se eluye con un primer buffer de citrato de sodio  
3.0l y posteriormente pH 4.25.



tro de masas.

Para demostrar que el Aldol se encuentra en todas las especies, se hizo lo mismo con colágena de Becerro. En la Gráfica X- se muestra el patrón de elución. Se observa un pico radioactivo-grande que eluye junto con glicina que corresponde a la Hidroxinorleucina. Sin embargo, con el cambio de buffer, en la región - donde eluye el Aldol, se observan dos picos radioactivos que no tienen una buena resolución.

Bailey y colaboradores (122), trabajando con colágena de - hueso de pollo, encontraron un compuesto que era el producto de condensación aldólica de dos aldehidos derivados de una hidroxilisina y el otro de lisina (Aldol de hidroxilisina). Este hecho sugiere que uno de los compuestos encontrados en piel de Becerro, puede corresponder al Aldol aislado por Bailey (122).

Como ha sido demostrado, la ozonólisis rompe los dobles enlaces y transforma a los carbonos que los contienen en grupos carbonilo (123). Como se observa en la Figura II, el aldol de lisina (A), tratado con ozono se rompe para formar dos compuestos nuevos. En este caso y para evitar la formación de peróxidos, se agregó botritio para convertir los carbonilos en hidroxilos. De estar presente el doble enlace, uno esperaría después de ozonólisis y reducción un aumento en la cantidad de tritio. En un experimento

GRAFICA X.

Hidrolizado alcalino del péptido puro de colágena de Becerro  
conteniendo el aldehido  $\alpha - \beta$  insaturado. Cromatografia -  
en la columna larga del analizador de aminoácidos. La mues--  
tra se eluye con un primer buffer de citrato de sodio pH ---  
3.01 y posteriormente pH 4.25.

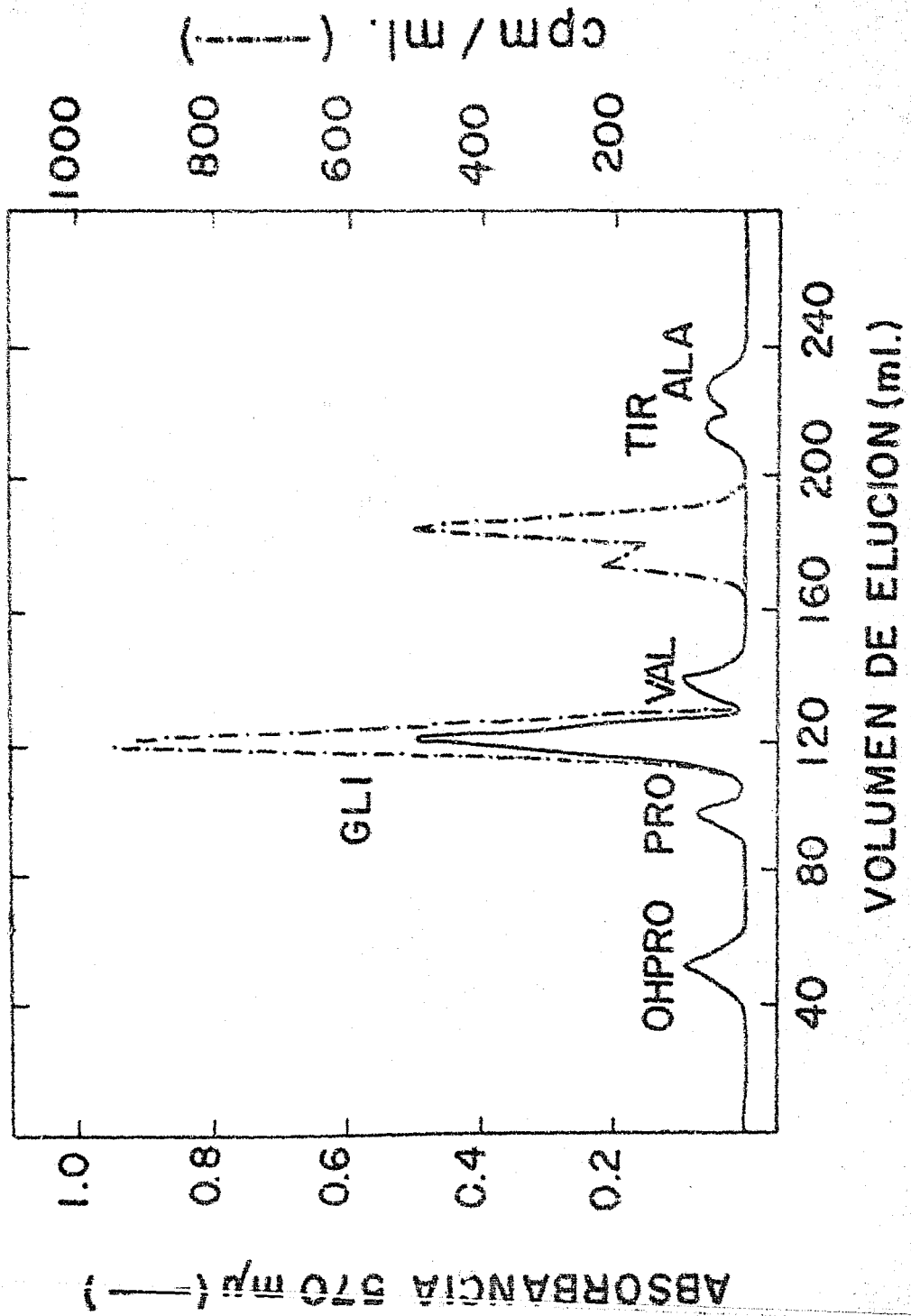
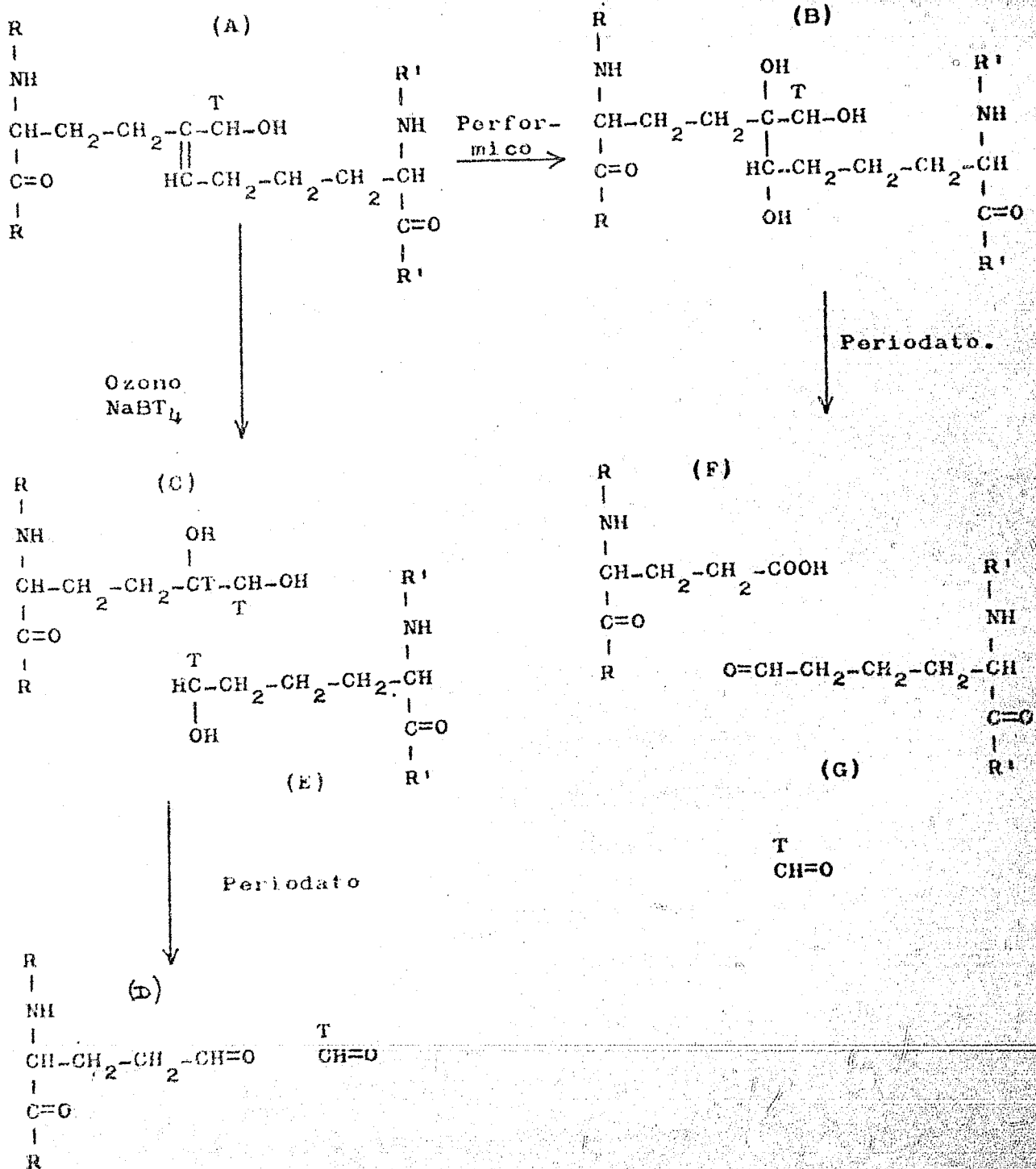


FIGURA II.

REACCIONES QUIMICAS EFECTUADAS PARA LA IDENTIFICACION DEL ENLACE INTRAMOLECULAR.



típico, una alícuota contenía 1560 cpm y después de ozonólisis, aumentó la radioactividad a 3234 cpm. Aunque el aumento es muy considerable, no se encontró una triplicación de las cuentas. Este valor debería encontrarse si el método fuera 100% eficiente. Estos resultados sugieren que la ozonólisis no es completa o bien, que se forman peróxidos que continúan la oxidación de los carbonilos.

Para demostrar que el aldehído  $\alpha$  -  $\beta$  insaturado es en realidad el enlace intramolecular, colágena nativa se sometió a ozonólisis y la concentración relativa de monómeros y dímeros se determinó por electroforesis en gel de acrilamida. En la Gráfica XI se muestran los trazos densitométricos de los geles teñidos con Amido Schwarz. Se observa una disminución importante de las cadenas  $\beta$  en la colágena ozonolizada comparada contra colágena normal.

Uno de los productos de la ozonólisis (Fig.II-C) tiene dos hidroxilos vicinales, por lo cual es susceptible a la oxidación con periodato. Su oxidación produce semialdehído glutámico (Fig.II-D) y formaldehído y se eliminan parte de las cuentas con el agua. En la Tabla III, se muestran los resultados obtenidos después de tratar colágena de Rata y Becerro, así como el péptido puro de Becerro, con ozono y periodato. Como era de esperarse, en ambos casos se observa una pérdida de tritio mayor del 65%, lo que demuestra claramente la presencia del doble enlace



GRAFICA XI.

Colágena de Rota. Trazo densitométrico de los geles de acrilamida teñidos con Amido Schwarz. Las muestras se corrieron 60 minutos con una corriente de 6 miliamperios por gel.

- a) Control.
- b) Ozonolisis.

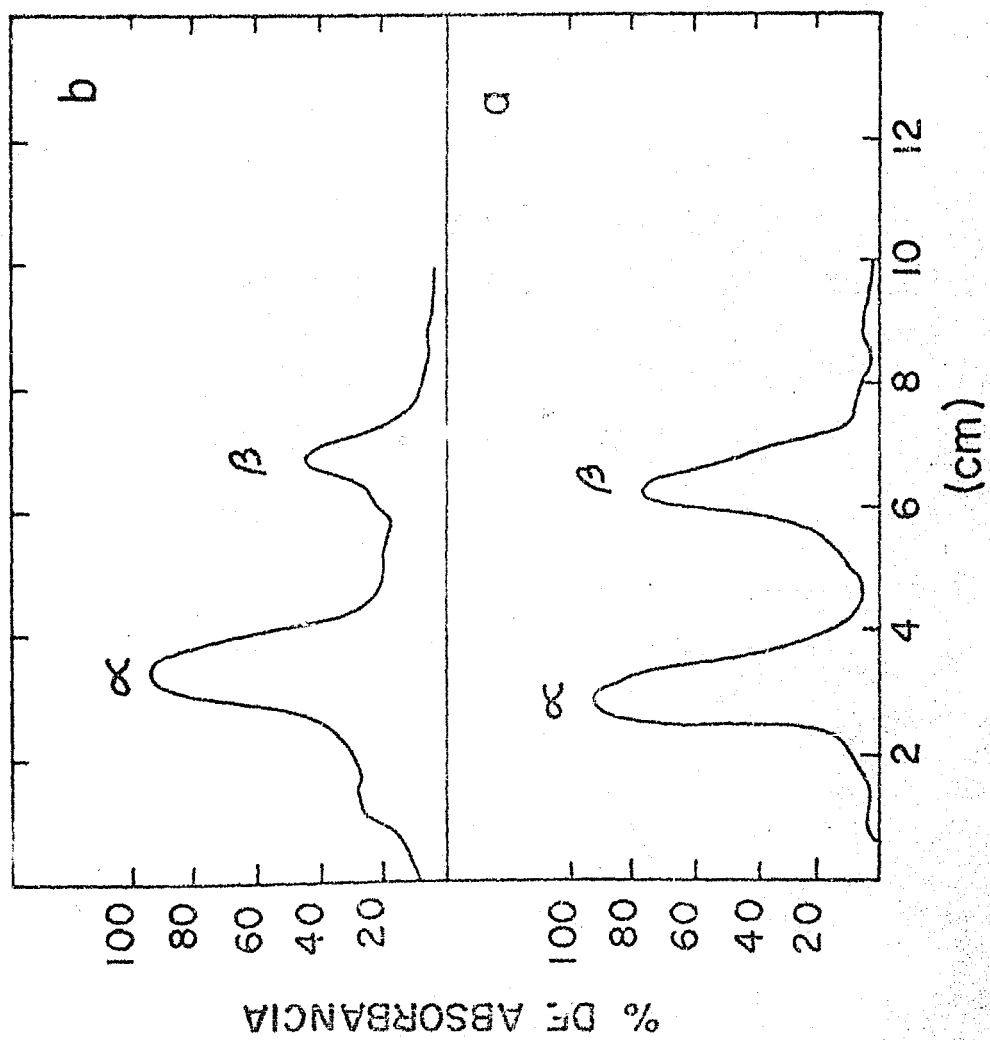


TABLA III.OXIDACION POR PERIODATO DEL ALDEHIDO  $\alpha$ - $\beta$  INSATURADO.

MUESTRA	% PERDIDA	
	BECERRO	RATA
COLAGENA TOTAL	42 %	8 %
COLAGENA TOTAL OZONO*	65 %	66 %
PEPTIDO PURO	24 %	9 %
PEPTIDO PURO OZONO*	80 %	+
PEPTIDO PURO PERFORMICO	63 %	40 %
$\beta$ 12 TOTAL	23 %	+
$\beta$ 11 TOTAL	18 %	+

+ NO SE DETERMINO

\* DESPUES DE OZONOLISIS SE REDUCE CON NABT4

en conjugación con el grupo aldehído que ha sido reducido. Estos datos también están de acuerdo con los espectros obtenidos por - Rojkind (74) y Bornstein (75) utilizando 2,4-dinitrofenilhidrazina y N-metil benzotiazolona hidrazona.

Otro método utilizado para corroborar la presencia del doble enlace es hidratandolo con ácido per fórmico. Esto convierte al Aldol de lisina (Fig.II-A) en el Aldol de hidroxilisina - - (FIG.II-B), y este último, por tener hidroxilos en carbonos veci nos, es susceptible a la oxidación por periodato. Uno de los productos de la oxidación es el ácido glutámico (Fig.II-F). Para de mostrarlo, se oxidó el Aldol de hidroxilisina con periodato, se cromatografió en papel descendente junto con un standard de Glu támico y se reveló con ninhidrina. Se encontró una mancha en el aldol oxidado con periodato que correspondía al Rf encontrado pa ra el ácido glutámico en este sistema. El otro producto de la -- oxidación con periodato es el  $\delta$  semialdehído del ácido  $\alpha$  amino adípico (Fig.II-G). Como se muestra en la Tabla III, el peptido puro de Becerro tratado con ácido per fórmico y periodato pierde el 63% de las cuentas y en el de Rata se pierde el 40%. Este dato sugiere que el rendimiento no es del 100%. Como control para este experimento, se determinó primero que no había pérdida de - tritio después de realizar la oxidación con ácido per fórmico. -- Otro control realizado fué el de oxidar las muestras directamen te con periodato. Como se observa en la Tabla III, la colágena -

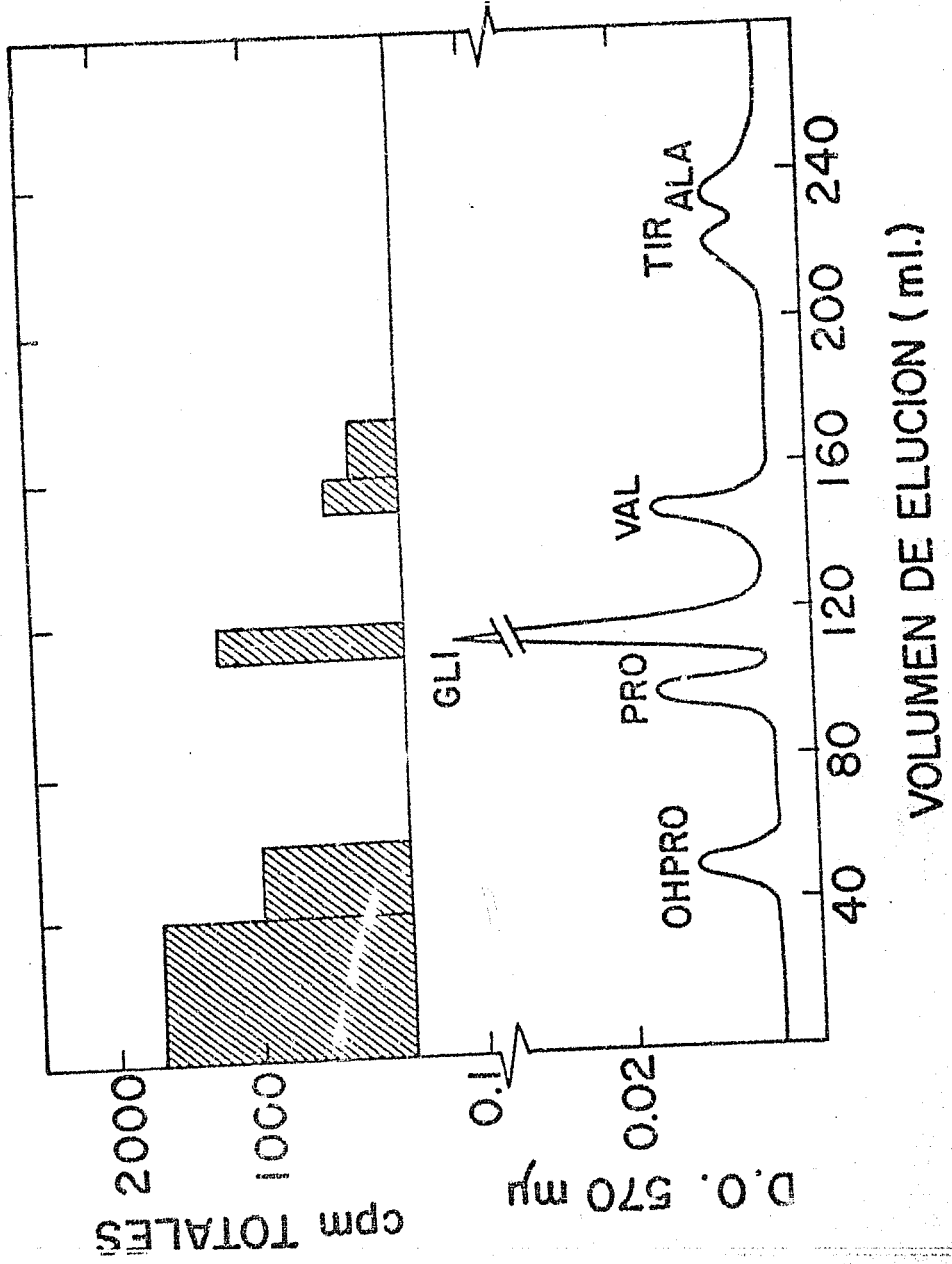
total de Rata o el péptido puro, incubados con periodato re- - -  
 tienen prácticamente el 100% de su radioactividad. Sin embargo, -  
 la colágena total, las cadenas aisladas o el péptido puro de Becer-  
 ro, muestran una pérdida importante de tritio al ser sometidos a oxidación con periodato. Estos resultados sugieren que en la colágena de Becerro existen dos compuestos: uno sensible a pe  
 riodato (Aldol de hidroxilisina) y otro insensible (Aldol de lisi  
 na). La colágena de Rata, por el contrario, muestra un solo Al--  
 dol (Aldol de lisina).

Para corroborar los datos obtenidos, alícuotas de las mues  
 tras tratadas se aplicaron en el Analizador de aminoácidos des--  
 pués de hidrolizar en álcali, localizando los compuestos por su-  
 radioactividad. En la Gráfica XII se muestran los resultados ob-  
 tenidos después de ozonolizar el péptido con el aldehído  $\alpha$ - $\beta$ -  
 insaturado obtenido de piel de Becerro. Comparando la proporción  
 entre los dos picos de Aldol de la colágena ozonolizada y la nor  
 mal (ver gráfica X), se encontró que al contrario de la colágena  
 sin tratar, el primer pico tiene un mayor porcentaje de cuentas-  
 que el segundo. Esto sugiere que el segundo pico corresponde al-  
 aldol con la doble ligadura (aldol de Lisina).

En la Gráfica XIII se muestra el efecto de la oxidación --  
 con ácido perfórmico y posteriormente con periodato. Después de-  
 oxidar con ácido perfórmico (Gráfica XIII-A), los picos radiacti-  
 vos que normalmente cromatografían entre valina y tirosina (Aldo

GRAFICA XII.

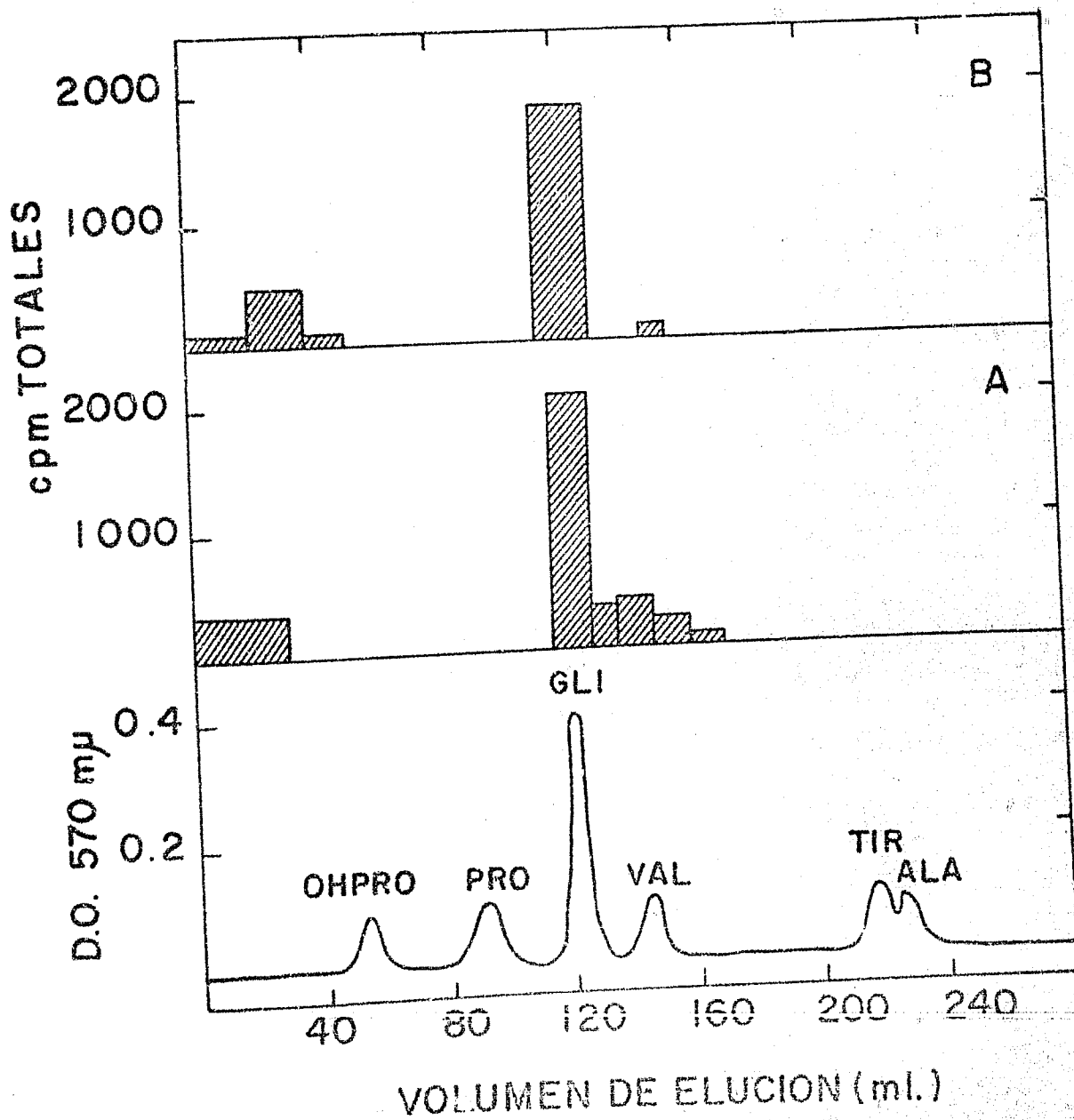
Hidrolizado alcalino del péptido puro de Becerro despues de Ozonolisis. Cromatografia en la columna larga del analizador de aminoácidos. La radioactividad se representa por las barras sombreadas.



GRAFICA XIII.

Péptido puro de Bacero. Cromatografía en la columna larga del analizador de aminoácidos. A) Oxidación con ácido per-  
fórmico. B) Oxidación con ácido per-  
fórmico y posteriormente meta-periodato de sodio.

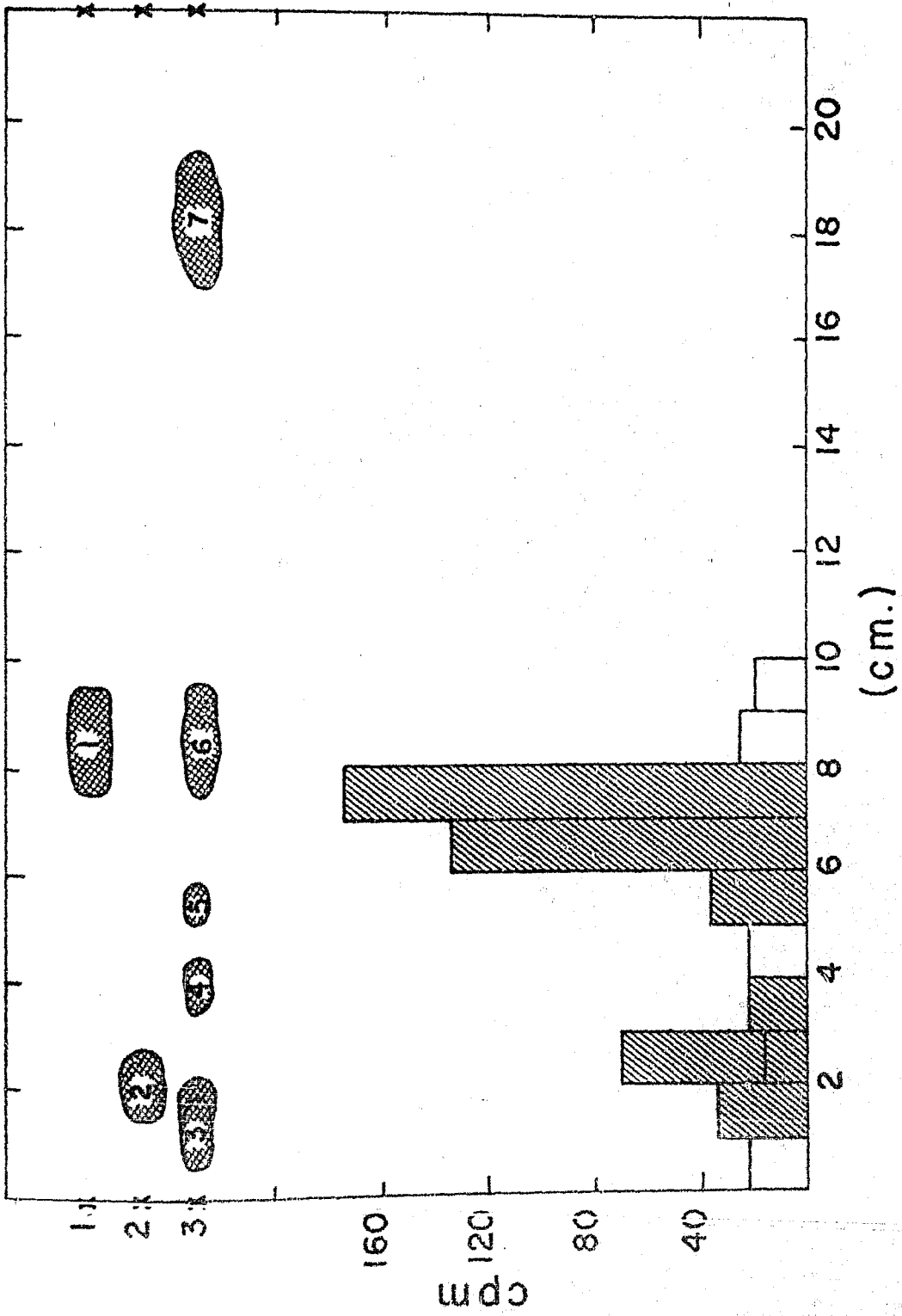




les), se convierten en un solo pico que aparece inmediatamente después del cambio de buffer. Este pico es altamente susceptible a la acción del periodato (Gráfica XIII-B) y más del 90% de las cuentas presentes en este compuesto se eliminan con el agua después de la oxidación. Este dato nuevamente viene a apoyar la presencia de los aldoles de lisina e hidroxilisina en la colágena de Becerro. Una vez aislados los Aldoles en el Analizador de aminoácidos y eliminadas las sales por cromatografía; se determinó el Rf de cada uno por cromatografía en papel descendente. En la Gráfica XIV se muestra es esquema de los resultados obtenidos. La mancha (1) corresponde a la Hidroxinorleucina, que en este sistema tiene un Rf de 0.33. La mancha (2), corresponde al Aldol que emerge en segundo lugar del analizador de aminoácidos y que por los datos anteriormente presentados se sugiere que sea el aldol de lisina. Las barras sombreadas representan la radiactividad lo cual confirma que esta mancha es realmente el aldol y no un contaminante. El 3 representa al primer aldol que emerge de la columna (Aldol de hidroxilisina), el cual presenta varias manchas a la ninhidrina, lo que indica que no estaba puro y no es de extrañarse, porque sale junto con metionina o leucina. Se encontraron contaminantes de Hidroxinorleucina así como del aldol, de lisina. Sin embargo, la radioactividad no coincidió con las manchas obtenidas con ninhidrina, lo que indica que el aldol de hidroxilisina tiene un Rf menor que la hidroxinorleucina como muestran las barras en la gráfica.

G R A F I C A   X I V .

Cromatografía descendente en papel de los aldoses aislados de colágena de Becerro. Eluyente: Butanol: ac. acético: -- agua (4:1:1).



## CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el presente trabajo, permiten sugerir que el mecanismo de formación y la estructura del enlace intramolecular, es idéntico en las colágenas de Rata y Becerro. Por esta razón, se sugiere también que este mecanismo puede ser el mismo para todas las colágenas de animales que no contengan cisteínas y no puedan formar puentes disulfuro.

En la colágena de piel de Rata se puede obtener un fragmento de igual tamaño y composición de aminoácidos cuando se usa Colagenasa bacteriana o CNBr en la obtención de ese péptido. Por el contrario, en la de Becerro hay diferencias entre el método enzimático y el químico. Esto sugiere que el residuo de metionina que es susceptible a CNBr no es el mismo residuo sobre el cual actúa la colagenasa. El péptido obtenido de ambas especies carece de grupo amino terminal y se encuentra colocado en el extremo N-terminal de la proteína. Estos péptidos además de tener el enlace intramolecular, son altamente antigénicos y se encuentran en la región no helicoidal de la proteína (111). En ambas especies pueden ser liberados por ruptura limitada con CNBr (121) o por ruptura limitada con enzimas proteolíticas, tales como Pepsina y Tripsina (121).

Ambas especies muestran características semejantes en la composición de aminoácidos de sus péptidos con el enlace intramolecular. En ambos casos faltan los aminoácidos básicos, carecen -

de hidroxiprolina, contienen tirosina y son ricos en aminoácidos polares como ácidos glutámico y ácido aspártico. Las diferencias de especie existentes son mínimas y corresponden a la presencia de leucina, isoleucina y fenil alanina.

Por los datos aquí presentados y los datos existentes en la literatura (124) (125), se puede asegurar que la colágena joven de Rata, Becerro y Embrión de pollo, tienen una lisina en posición cercana al grupo N-terminal. Como parte del proceso normal de maduración, una enzima específica (77) desamina oxidativamente el grupo  $\epsilon$ -amino y convierte a la lisina en el  $\delta$  semialdehído del ácido  $\alpha$  amino adípico. Posteriormente, los aldehidos de dos cadenas vecinas se condensan aldólicamente (78) para formar un  $\beta$ -hidroxi aldehído que fácilmente se deshidrata para formar el Aldol. No es posible asegurar con exactitud si el aldehído de la colágena tisular antes de su extracción es el  $\beta$ -hidroxi aldehído o el Aldol. Se sabe que los  $\beta$ -hidroxi aldehidos se deshidratan con suma facilidad para convertirse en aldehidos  $\alpha$ - $\beta$  insaturados.

Este tipo de enlace tiene la enorme ventaja de ser espontáneo una vez que se forma el aldehído e indica solamente que el requerimiento energético para la formación de este enlace es muy bajo. Deshmuk y Nimni (126) han demostrado que el Aldol se forma "In vitro" cuando la colágena se incubaba a 37°C en buffer de fosfatos a pH neutro.

Finalmente, conociendo la estructura y función de los enlaces, se puede explicar como actúan el gran grupo de compuestos -- que producen la alteración llamada Latirismo. Unos actúan blo----- queando la enzima (77), otros combinándose con los aldehídos (92) y otros podrían tener un mecanismo doble: bloquear la enzima y -- combinarse con el aldehído (94).

La presencia de un Aldol derivado de hidroxilisina en la - colágena de Becerro, indica que la enzima responsable de la formación de la Allisina (  $\delta$  semialdehído del ácido  $\alpha$  amino adípi-- co), no distingue entre la lisina o hidroxilisina. Al mismo tiempo se puede pensar que la enzima responsable de la hidroxilación- de lisina para convertirla en hidroxilisina, puede actuar sobre - este residuo importante antes de que sea desaminado.

Los datos aquí presentados permiten establecer que el Al-- dol (lisina) es el enlace Intramolecular, sin embargo, no se pue- de asegurar que el aldol de hidroxilisina sea un enlace intramolecular. Es posible que este tipo de Aldol se forme, como sugiere - Bailey (122), entre la lisina de una tropocolágena y la hidroxilisina de otra (Enlace Intermolecular).

## BIBLIOGRAFIA

1. Neuberger A. and Richards F.F.  
Mammalian Protein Metabolism  
H.N. Munro y J.B. Allison Eds. Vol. I p. 243  
Academic Press, New York.
2. Roy O. Greep  
Histologia. Mesenquima y Tejido Conectivo.  
Ed. El Ateneo.
3. Bjorksten J.  
Aging, Primary mechanism  
Gerontologia, 8, 179-182 (1963).
4. Neuberger A., Perrone J.C. and Slack H.G.B.  
The relative metabolic inertia of tendon collagen in Rat.  
Biochem. J. 49, 199 (1951).
5. Boedtker H. and Doty P.  
J. Am. Chem. Soc. 77, 248 (1955).
6. Lewis M.S. and Piez K.A.  
Sedimentation equilibrium studies of the molecular weight of  
single and double chains from Rat skin Collagen.  
Biochemistry 3, 1126-1131 (1964).
7. Piez K.A., Bladen H.A., Lane J.P., Miller E.J., Bornstein P.,  
Butler W.T. and Kang A.H.  
Comparative studies on the chemistry of collagen utilizing  
cyanogen bromide cleavage.  
Brookhaven Symposia in Biology 21, 345-357 (1968).
8. Piez K.A., Eigner E. and Lewis M.S.  
The chromatographic separation and amino acid composition of  
the subunits of several collagens.  
Biochemistry 2, 58 (1963).
9. Piez K.A.  
Non identity of the three  $\alpha$  chains in Codfish skin collagen.  
J. Biol. Chem. 239, 4315-4316 (1964).
10. Piez K.A.  
Characterization of a collagen from Codfish skin containing  
three chromatographically different  $\alpha$  chains.  
Biochemistry 4, 2590-2596 (1965).



11. Francois C.J. and Glimcher M.J.  
The separation of the  $\alpha$  chains of collagen by free-flow electrophoresis.  
Biochem. J. 102, 148-152 (1967).
12. Heidrich H.G. and Wynston L.K.  
The presence of a third  $\alpha$  component in Calf and Rat skin tropocollagen.  
Z. Physiol. Chem. 342, 166-169 (1965).
13. Francois C.J. and Glimcher M.J.  
The isolation and aminoacid composition of the  $\alpha$  chains of chicken bone collagen.  
Biochim. Biophys. Acta 133, 91-96 (1967).
14. Kang A.H., Piez K.A. and Gross J.  
Characterization of the  $\alpha$  chains of chick skin collagen and the nature of the NH<sub>2</sub>-terminal cross-link region.  
Biochemistry 8, 3648-3655 (1969).
15. Gallop P.M., Seifter S. and Meilman E.  
Occurrence of Ester-Like linkages in collagen  
Nature 183, 1659 (1959).
16. Petruska J.A. and Hodge A.J.  
A subunit model for the tropocollagen macromolecule.  
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 51, 871-876 (1964).
17. Butler W.T.  
The identity of a hydroxylamine-sensitive bond in the  $\alpha$  I chains of rat skin collagen.  
J. Biol. Chem. 244, 3415-3422 (1969).
18. Bornstein P.  
The nature of a hydroxylamine-sensitive bond in collagen  
Biochem. Biophys. Res. Commun. 36, 957 (1969).
19. Rich A. and Crick F.H.C.  
The structure of collagen  
Nature 176, 915 (1955).
20. Ramachandran G.N., Sasisekharan V and Thathachari Y.T.  
Collagen  
Ed. N. Ramanathan p.81 (1962)  
Wiley, New York.

21. Ramachandran G.N. and Kartha G.  
Structure of collagen  
Nature 176, 593 (1955).
22. Cowman P.M., McGavin S. and North A.C.T.  
The polypeptide chain configuration of collagen  
Nature 176, 1062 (1955).
23. Ramachandran G.N. and Chandrasekharan R.  
Interchain hydrogen bond via bound water molecules in the  
collagen triple helix.  
Biopolymers 6, 1649-1658 (1968).
24. Piez K.A., Lewis M.S., Martin G.R. and Gross J.  
Subunits of the collagen molecule  
Biochim. Biophys. Acta 53, 596 (1961).
25. Wood G.C.  
The heterogeneity of collagen solutions and its effect on  
fibril formation.  
Biochem. J. 84, 429-435 (1962).
26. Gallop P.M.  
Particle size and shape in a citrate extract of Ichthyocol  
Arch. Biochem. Biophys. 54, 486 (1955).
27. Maning M.J. and Meister A.  
Conversion of proline to collagen hydroxyproline  
Biochemistry 5, 1154-1165 (1966).
28. Peterkofsky B. and Udenfriend S.  
The cell free biosynthesis of collagen and its relationship  
to the hydroxylation of proline.  
J. Biol. Chem. 238, 3866-3877 (1963).
29. Bornstein P. and Piez K.A.  
A biochemical study of human skin collagen and the relation  
between intra and intermolecular crosslinking  
J. Clin. Invest. 43, 1813-1823 (1964).
30. Gross J., Highberger J.H. and Schmitt F.O.  
Extraction of collagen from connective tissue by neutral salt  
solutions.  
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 41, 1-8 (1955).
31. Schmitt F.O., Gross J. and Highberger J.H.  
A new particle type in certain connective tissue extracts.  
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 39, 459 (1953).

32. Gross J., Highberger J.H. and Schmitt F.O.  
Collagen structures considered as states of aggregation of a  
Kinetic unit. The tropocollagen particle.  
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 40, 679-688 (1954).
33. McBride O.W. and Harrington W.F.  
Evidence for disulfide crosslinkages in an invertebrate colla  
gen.  
J. Biol. Chem. 240, 4545-4547 (1965).
34. Franzblau C. and Lent R.W.  
Studies on the chemistry of Elastin. Structure, Function and  
Evolution in proteins.  
Brookhaven Symposia in Biology 21, 358-377 (1968).
35. King N.J. and Bailey S.T.  
Preliminary analysis of the proteins of the primary walls of  
some plant cells.  
J. Exptl. Botany 16, 294-303 (1965).
36. Radhakrishnan A.M. and Giri K.V.  
Bioche. J. 58, (1954).
37. Butler W.T. and Cunningham L.W.  
Evidence for the linkage of a disaccharide to hydroxylysine  
in tropocollagen.  
J. Biol. Chem 241, 3882-3888 (1966).
38. Schrotenloher R.E., Ogle J.D. and Logan M.A.  
Two Tripeptides from an enzymatic digest of collagen  
J. Biol. Chem. 234, 58 (1959).
39. Hanning K. and Nordwig A.  
Sequence studies in the nonpolar regions of collagen  
Collagen Symposium. The Hague (Scheveningen). The Netherlands.  
August 23-25, 1963.
40. Noda H. and Funakoshi H.  
Structure of the collagen molecule  
International Collagen Symposium. Velké Karlovice,  
Czechoslovakia, sept. 2-6, 1963.
41. Bear R.S.  
The structure of collagen molecules and fibrils  
J. Biophys. Biochem. Cytol. 2, 263 (1956).
42. Ramachandran G.N. and Sasisekharan V.  
Nature 190, 1004 (1961).

43. Michaelis S., Gallop P.M., Seifter S. and Meilman E.  
Studies on the specificity of Collagenase.  
Biochim. Biophys. Acta 29, 450-451 (1958).
44. Nordwig A. and Strauch L.  
Stability of collagenase from *Cl. histolyticum*  
Z. Physiol. Chem. 330, 153-160 (1963).
45. Greenberg J., Fishman L. and Levy M.  
Positions of aminoacids in mixed peptides produced from  
collagen by the action of Collagenase  
Biochemistry 3, 1826-1831 (1964).
46. Grassmann W., Hanning K. and Nordwig A.  
Z. Physiol. Chem. 333, 154 (1963).
47. Nagai Y. and Noda H.  
The specificity of Collagenase  
Biochim. Biophys. Acta 34, 298-299 (1959).
48. Grassmann W. and Nordwig A.  
Z. Physiol. Chem. 322, 267 (1960).
49. Bear R.S.  
The structure of collagen fibrils  
Advances in Protein Chemistry 7, 69 (1952).
50. Witkop B.  
Non enzymatic methods for the preferential and selective  
cleavage and modification of proteins  
Advances in Protein Chemistry, 16, 221 (1961)
51. Gross E. and Witkop B.  
J. Am. Chem. Sec. 83, 510 (1961).
52. Nordwig A. and Dick Y.P.  
Cleavage with cyanogen bromide of methionyl bonds in collagen  
Biochim. Biophys. Acta 97, 179-182 (1965).
53. Bornstein P. and Piez K.A.  
Collagen. Structural studies based on the cleavage of  
methionyl bonds.  
Science 148, 1353-1355 (1965).
54. Kang A.H., Piez K.A. and Gross J.  
Characterization of the  $\alpha$  chains of chick skin collagen  
Biochemistry 8, 3648-3655 (1969).

55. Kang. A.H., Igarashi S. and Gross J.  
Characterization of the cyanogen bromide peptides from the  $\alpha$  2 chain of chick skin collagen.  
Biochemistry 8, 3200-3204 (1969).
56. Miller E.J., Lane J.M. and Piez K.A.  
Isolation and characterization of the peptides derived from the  $\alpha$  1 chain of chick bone collagen after cyanogen bromide cleavage.  
Biochemistry 8, 30-39 (1969).
57. Lane J.M. and Miller E.J.  
Isolation and characterization of the peptides derived from the  $\alpha$  2 chain of chick bone collagen after cyanogen bromide cleavage.  
Biochemistry 8, 2134-2139 (1969).
58. Butler W.T., Piez K.A. and Bornstein P.  
Isolation and characterization of the cyanogen bromide peptides from the  $\alpha$  1 chain of rat skin collagen  
Biochemistry 6, 3771-3780 (1967).
58. Butler W.T., Piez K.A. and Bornstein P.  
Isolation and characterization of the cyanogen bromide peptides from the  $\alpha$  1 chain of rat skin collagen  
Biochemistry 6, 3771-3780 (1967)
59. Piez K.A., Miller E.J., Lane J.M. and Butler W.T.  
The order of the CNBr peptides from the  $\alpha$  1 chain of collagen  
Biochem. Biophys. Res. Commun. 37, 801-805 (1969)
60. Fietzek P.P. and Piez K.A.  
Isolation and characterization of the cyanogen bromide peptides from the  $\alpha$  2 chain of rat skin collagen  
Biochemistry 8, 2129-2133 (1969)
61. Kan A.H., Bornstein P. and Piez K.A.  
The amino acid sequence of peptides from the cross-links region of rat skin collagen  
Biochemistry 6, 788-795 (1967)
62. Bornstein P.  
Comparative sequence studies of rat skin and tendon collagen. I. Evidence for incomplete hydroxylation of individual prolyl residues in the normal proteins.  
Biochemistry 6, 3082-3093 (1967)

63. McBride O.W. and Harrington W.F.  
Ascaris cuticle collagen : on the disulfide cross-linkages --  
and the molecular properties of the subunits.  
Biochemistry 6, 1484-1498 (1967)
64. Veis A. and Schlueter R.J.  
The macromolecular organization of dentine matrix collagen  
I. Characterization of dentine collagen.  
Biochemistry 3, 1550-1557 (1964)
65. Harding J.J.  
The unusual link and cross links of collagen  
Advanced Protein Chemistry 20, 109-190 (1965)
66. Landucci J.M.  
Recherche sur les aldehydes existant dans les gelatines.  
Bull. Soc. Chem. (France) 21, 120 (1954).
67. Landucci J.M., Pouradier J. and Deuarte M.  
Recent Advances in Gelatin and Glue Research  
Proc. Conf. Univ. Cambridge 1957, 62-67 (1958)
68. Gustavson K.H.  
Recent advances in Gelatin and Glue Research  
Proc. Conf. Univ. Cambridge 1957, 15-19 (1958)
69. Levence C.I.  
Studies on the mode of action of Lathyrogenic compounds  
J. Exptl. Med. 116, 119 (1962)
70. Blumenfeld O.O. and Gallop P.M.  
The participation of aspartil residues in the hydroxylamine-  
sensitive bonds in collagen  
Biochemistry 1, 947 (1962)
71. Milch R.A.  
Gerontologia 7, 129 (1963)
72. Gallop P.M.  
Concerning some special features of the collagen molecule  
Biophys. J. 4, 79 (1964)
73. Rojkind M., Blumenfeld O.O. and Gallop P.M.  
Isolation of an aldehyde-containing peptide from tropocolla-  
gen  
Biochem, Biophys. Res. Commun. 17, 320-325 (1964)



74. Rojkind M., Blumenfeld O.O. and Gallop P.M.  
Localization and partial characterization of an aldehydic component in tropocollagen.  
J.Biol. Chem. 241, 1530-1536 (1966)
75. Bornstein P., Kang A.H. and Piez K.A.  
The nature and location of intramolecular cross links in collagen.  
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 55, 417-424 (1966)
76. Bornstein P. and Piez K.A.  
The nature of the intramolecular cross-links in collagen. The separation and characterization of peptides from the cross-link region of rat skin collagen.  
Biochemistry 5, 3460-3473 (1966)
77. Pinell S.R. and Martin G.R.  
The crosslinking of collagen and Elastin: Enzymatic conversion of lysine in peptide linkage to  $\alpha$  amino adipic  $\delta$  semialdehyde (Allysine) by an extract from bone.  
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 61, 708-714 (1968)
78. Rojkind M. Rhi L. and Aguirre M.  
Biosynthesis of the intramolecular cross-links in rat skin collagen  
J.Biol. Chem. 243, 2266-2272 (1967)
79. Levene C.I. and Cross J.  
Alterations in state of molecular aggregations of collagen induced in chick embryos by  $\beta$  - aminopropionitrile (Lathyrus factor).  
J. Exptl. Med. 110, 771-790 (1959)
80. Martin G.R., Piez K.A. and Lewis M.S.  
The incorporation of  $C^{14}$ -glycine into the subunits of collagens from normal and Lathyrus animals.  
Biochim. Biophys. Acta 69, 472-479 (1963)
81. Gross J.  
An intermolecular defect of collagen in experimental Lathyrism  
Biochim. Biophys. Acta 71, 250-252 (1963)
82. Fessler J.H. and Bailey A.J.  
The cleavage In Vitro of the cross links in gelatin by  $\beta$ -amino propionitrile.  
Biochim. Biophys. Acta 117, 368-378 (1966)

83. Smiley J.D., Yeager H. and Ziff M.  
Collagen metabolism on Osteolathyrism in chick embryos: site of action of  $\beta$ -aminopropionitrile.  
J. Exptl. Med. 116, 45-54 (1962)
84. Norton T.B. and Desler W.  
Inhibition of germination of *Aspergillus niger* conidia by aminopropionitrile and its reversal by certain aldoses.  
Experientia 19, 627 (1963)
85. RojKind M. and Juarez H.  
The nature of the collagen defect in Lathyrism  
Biochem. Biophys. Res. Commun. 25, 481-486 (1966)
86. Page R.C. and Benditt E.P.  
Molecular diseases of connective and vascular tissues, II. -- amine oxidase inhibition by the Lathyrigen  $\beta$ -aminopropionitrile.  
Biochemistry 6, 1142 (1967)
87. Page R.C. and Benditt E.P.  
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 124, 454-459 (1967)
88. Chou W.S., Savage J.E. and O'Dell B.L.  
Relation of monoamine oxidase activity and collagen crosslinking in cooper-deficient and control tissues.  
Pro. Soc. Exptl. Biol. Med. 128, 948-952 (1968)
89. Rucker P.B., Parker H.E. and Rogler J.C.  
The effects of cooper on collagen crosslinking  
Biochem. Biophys. Res. Commun. 34, 28-33 (1969)
90. O'Dell B.L., Elsdon D.F., Thomas J., Partridge S.M., Smith R.H. and Palmer R.  
Nature 209, 401-402 (1966)
91. Wood G.C.  
The reaction of semicarbazide with collagen  
J. Pharm. Pharmacol. 15, Suppl. 134-136 (1963)
92. Convy S. and Wynn C.H.  
The action of semicarbazide on the aggregation of the tropo-- collagen macromolecule.  
Biochem. J. 98, 46 (1966)



93. Tanze: M., Monroe D. and Gross J.  
Inhibition of the intermolecular cross link in collagen by --  
thiosemicarbazide.  
Biochemistry 5, 1919 (1966)
94. RojKind M. and Gutierrez A.M.  
The Binding of thiosemicarbazide to collagen In Vitro. .-  
Arch. Biochem. Biophys. 131, 116-122 (1969).
95. Nimni M.E. and Bavetta L.A.  
Collagen defect induced by Penicillamine  
Science 150, 905-907 (1965)
96. Nimni M.E.  
Accumulation of a collagen precursor in the skin of Penici--  
llamine treated rats  
Biochim. Biophys. Acta 111, 576-579 (1965)
97. Nimni M.E., Deshmukh K. and Bavetta L.A.  
Turnover and age distribution of a collagen fraction extrac--  
table from rat by mercaptoethylamine.  
Arch. Biochem. Biophys. 122, 292-298 (1967).
98. Deshmukh and Nimni M.E.  
A defect in the intramolecular and intermolecular cross ----  
linking of collagen caused by penicillamine. II Functional -  
groups involved in the interaction process.  
J. Biol. Chem 244, 1787 (1969).
99. Blumenfeld O.O., Paz M.A., Gallop P.M. and Seifter S.  
The nature, quantity and mode of attachment of hexoses in --  
Ichthyocol.  
J. Biol. Chem 238, 3835-3839 (1963)
100. Spiro R.G.  
Characterization and quantitative determination of the  
hydroxylysine linked carbohydrate units of several collagens  
J. Biol. Chem. 244, 602-612 (1969)
101. Green J.H., Ralph B.J. and Schofield P.J.  
Nature 198, 754 (1963)
102. Goldberg B. and Green H.  
The synthesis of collagen and protocollagen hydroxylase by  
fibroblastic and non fibroblastic cell lines.  
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 59, 1110 (1968)

103. Popenoe E.A., Aronson R.B. and Van Slyke D.D.  
Hydroxylysine formation from lysine during collagen biosynthesis.  
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 55, 393 (1966)
104. Van W., Robertson B. and Schwartz B.  
J. Biol. Chem 201, 689 (1953)
105. Fujimoto D. And Tamiya N.  
Studies on collagen metabolism with O<sup>18</sup> as a tracer  
Biochim. Biophys. Acta 559-561 (1963)
106. Juva K., Prockop D., Cooper G. and Lash J.  
Hydroxylation of proline and the intracellular accumulation of a polypeptide precursor of collagen  
Science 152, 92-94 (1966)
107. Peterkofsky B. and Udenfriend S.  
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 53, 335 (1965)
108. Hutton J.J. Jr. Marglin A., Witkop B., Kurtz J., Berger A. and Udenfriend S.  
Synthetic polypeptides as substrates and inhibitors of collagen proline hydroxylase.  
Arch. Biochem. Biophys. 125, 779-785 (1968)
109. Seifter S. and Gallop P.M.  
Aspects of the immunology of collagen  
International Collagen Symposium. Czechoslovakia 1963
110. Maurer P.H.  
Arch. Biochem. Biophys. 58, 205 (1955)
111. Schmitt F.O., Levine L., Drake M.P., Rubin A.L., Pfahl D. and Davison P.F.  
The antigenicity of tropocollagen  
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 51, 493-497 (1964)
112. Peterson and Sober H.A.  
Column chromatography of proteins: substituted celluloses  
Methods of Enzymology.  
S.P. Colowich and N.O. Kaplan. Vol V, p.3. (1962)  
Academic Press. New-York
113. Gallop P.M., Blumenfeld O.O. Henson E. and Shneider A.L.  
Isolation and identification of  $\alpha$ -amino aldehydes in collagen  
Biochemistry 7, 2409-2430 (1968)

114. Woessner J.F.  
Arch. Biochem. Biophys. 93, 440 (1961)
115. Spackman D.H., Stein W.H. and Moore S.  
Automatic recording apparatus for use in the chromatography  
of amino acids.  
Anal. Chem. 30, 1190 (1958)
116. Moore S.  
J. Biol. Chem. 238, 235 (1963)
117. Mac Fadyen D.A.  
J. Biol. Chem. 158, 107 (1945)
118. Nagai Y., Gross J. and Piez K.A.  
Disc electrophoresis of collagen components  
Ann. N.Y. Acad. Sci. 121, 494 (1964)
119. Rosen H.  
Arch. Biochem. Biophys. 67. 10 (1957)
120. Bowes J.H. and Moss J.A.  
Biochem. J. 55, 735 (1953)
121. Bornstein P., Kang A.H. and Piez K.A.  
The limited cleavage of native collagen with Chymotripsin,  
Trypsin and cyanogen bromide.  
Biochemistry 5, 3803-3812 (1966)
122. Bailey A.J., Fowler L.J. and peach M.  
Identification of two interchain crosslinks of bone and den  
tine collagen  
Biochem. Biophys. Res. Commun. 35, 663-671 (1969)
123. Morrison and Boyd  
Organic Chemistry, Chap. 6  
Second Edition  
Allyn and Bacon Inc. Boston 1966.
124. RojKind M., Gutierrez A.M. Reichner M. and Lent R.W.  
The nature of the intramolecular cross link in collagen  
Biochem. Biophys. Res. Commun. 36, 350-356 (1969)
125. Kang A.H., Faris B. and Franzblau C.  
Intramolecular cross link of chick skin collagen  
Biochem. Biophys. Res. Commun. 36, 345-349 (1969)

126. Deshmukh K. and Nimni M.E.

In Vitro formation of intramolecular cross-links in tropocollagen.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 35, 845 (1969)