



УДК 577.155.2.03

ВНЕКЛЕТОЧНАЯ РНКазы C_2 *ASP. CLAVATUS*.II. ИССЛЕДОВАНИЕ СТРУКТУРНЫХ СОСТОЯНИЙ МЕТОДОМ
ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ СПЕКТРОСКОПИИ*Грищенко В. М., Емельяненко В. И., Искова М. Н.,
Везбородова С. И., Бурштейн Э. А.**Институт биохимии и физиологии микроорганизмов
Академии наук СССР**Институт биологической физики Академии наук СССР, Пущино*

На основании анализа флуоресцентных параметров и результатов тушения флуоресценции РНКазы C_2 и T_1 ионами Cs^+ и I^- сделан вывод о локализации единственного остатка триптофана этих ферментов в низкополярном жестком микроокружении. Исследовано влияние pH, различных концентраций KCl и диоксана, а также температуры на положение спектров, квантовый выход флуоресценции остатка триптофана РНКазы C_2 и на величину эффективности переноса энергии с остатков тирозина на триптофан. Сделано предположение о локализации в непосредственном окружении индольного хромофора имидазольной, карбоксильной и фенольной групп. Показано наличие конформационной перестройки, вызывающей изменение структурных и физических свойств области окружения индольного хромофора и связанной с ионизацией близлежащих имидазольной и (или) карбоксильной групп.

Внеклеточная гуанилспецифичная РНКазы C_2 *Aspergillus clavatus* (КФ 3.1.4.8), выделенная и описанная Морозовой и др. [1], является аналогом РНКазы T_1 *Asp. oryzae* и ряда других гуаниловых РНКаз грибов [2]. Ранее было показано, что в активный центр РНКазы C_2 входят по меньшей мере одна имидазольная и одна карбоксильная группы [3]. Настоящая работа, посвященная изучению состояния единственного остатка триптофана РНКазы C_2 , является продолжением исследования структурно-функциональной роли остатков ароматических аминокислот этого фермента [4]. Используя остаток триптофана в качестве естественной «репортерной» метки, мы попытались идентифицировать с помощью метода флуоресцентной спектроскопии [5] функциональные группы, локализованные в окружении индольного хромофора, а также охарактеризовать некоторые физико-химические свойства этой области структуры РНКазы C_2 . Для сравнения были измерены также спектры флуоресценции РНКазы T_1 и определены некоторые ее флуоресцентные параметры.

Флуоресценцию ферментов измеряли при возбуждении светом ртутных линий при длине волны 280,4 нм, при которой поглощают остатки тирозина и триптофана, и при длине волны 296,7 нм, при которой поглощает практически только остаток триптофана, а вклад в поглощение двух дисульфидных групп цистина РНКазы C_2 и T_1 незначителен. Спектр флуоресценции РНКазы C_2 при обеих длинах волн возбуждения ($\lambda_{в}$) имеет одну и ту же форму; это свидетельствует о том, что остатки тирозина этого

Параметры флуоресценции РНКаз S_2 и T_1 при pH 6,0

РНКазы	λ_B , нм	$\lambda_{\text{макс}}$, нм	$\Delta\lambda$, нм	q	γ
S_2	296,7	330	48	0,32	0,70 \pm 0,05
	280,4	330	50	0,24	
T_1	296,7	320, 330	46	0,46	0,30 \pm 0,1
	280,4	320, 330	46	0,24	
T_1 [8]	295	325	—	0,44	0,40 \pm 0,2
	280	325	—	0,26	

фермента практически не флуоресцируют. Некоторая структурированность спектра, коротковолновое положение его максимума ($\lambda_{\text{макс}}$ 330 нм, рис. 1) и аномально высокие значения квантового выхода флуоресценции (табл. 1) указывают на то, что единственный остаток триптофана РНКазы S_2 локализован в участке белковой глобулы, который характеризуется малой подвижностью, недоступностью молекулам воды и отсутствием тушащих групп. Такие флуоресцентные параметры остатка триптофана РНКазы S_2 соответствуют спектральной форме ИБ в модели трех дискретных состояний остатка триптофана в белке [6].

В 8 М мочевины, обратимо инактивирующей фермент [7], исчезает структурированность спектра, $\lambda_{\text{макс}}$ сдвигается в длинноволновую сторону до 350 нм (рис. 2), полуширина спектра ($\Delta\lambda$) увеличивается до 60 нм, величина квантового выхода (q) уменьшается до 0,2 при обеих длинах λ_B . Иными словами, остаток триптофана РНКазы S_2 , денатурированной 8 М мочевиной, по своим флуоресцентным параметрам подобен свободному триптофану в воде, т. е. в выбранных денатурирующих условиях происходит полное разрушение гидрофобного окружения остатка триптофана РНКазы S_2 , в результате чего он становится доступным молекулам воды. Помимо этого в спектре флуоресценции при λ_B 280,4 нм появляется тирозильный компонент (рис. 2).

Из сравнения спектров (рис. 1) и параметров флуоресценции (табл. 1) РНКаз T_1 и S_2 возникает вполне правомерное предположение, что окружение остатка триптофана в обоих ферментах в значительной степени сходно. Весьма вероятно, что область локализации остатка триптофана в РНКазе T_1 характеризуется несколько меньшей полярностью и (или) большей жесткостью и по своим свойствам напоминает «углеводородную» область [8]. Это подтверждается и более коротковолновым положением $\lambda_{\text{макс}}$ (325 нм) спектра РНКазы T_1 . Тем не менее окружение остатков триптофана в РНКазах T_1 и S_2 еще не является предельно жестким и неполярным среди встречающихся в белках. Так, спектр флуоресценции единственного остатка триптофана *L*-аспарагиназы *E. coli* имеет хорошо разрешенную тонкую структуру с главным пиком при 319 нм [9, 10], а триптофаниловый спектр азурина *Pseudomonas fluorescens* обладает уникальным по степени разрешения тонкой структуры и положению $\lambda_{\text{макс}}$ (308 нм) спектром, напоминающим спектры индола в замороженных низкополярных средах [10].

Как и в РНКазе S_2 , в спектре флуоресценции РНКазы T_1 отсутствует тирозильный компонент [11, 12]. Однако Понгс [13, 14] сообщил о наличии тирозильной флуоресценции в нативной РНКазе T_1 на основании интенсивности флуоресценции (λ_i) при 295 нм (λ_B 280 нм). Отсутствие в работе экспериментальных данных по флуоресценции при $\lambda_B > 280$ нм, а также поправок на светорассеяние и спектральную чувствительность прибора вызывает сомнение в правомерности этого утверждения.

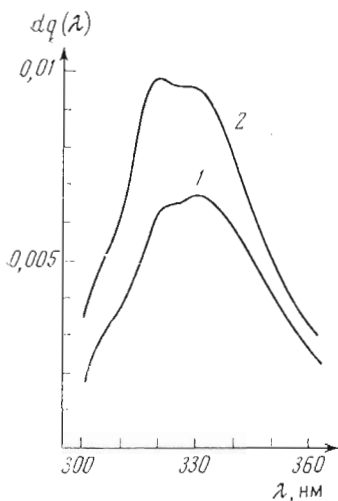


Рис. 1

Рис. 1. Спектры флуоресценции РНКазы C_2 (1) и РНКазы T_1 (2) при рН 6,0 и возбуждении 296,7 нм

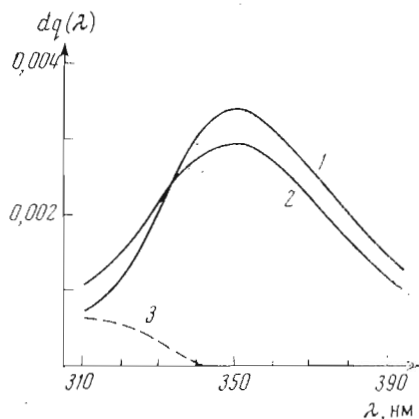


Рис. 2

Рис. 2. Спектры флуоресценции РНКазы C_2 в 8 М мочевины при возбуждении 296,7 (1) и 280,4 нм (2); 3 — тирозиловый компонент спектра (в отн. ед.)

Рис. 3. Влияние рН на квантовый выход (1), эффективность переноса энергии (2) и положение спектров (3) РНКазы C_2 при возбуждении 296,7 нм

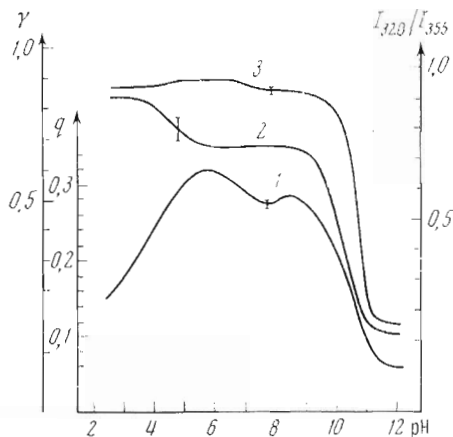


Рис. 3

Для более детального изучения участка структуры в окружении индольного хромофора РНКазы C_2 было проведено исследование влияния рН на следующие флуоресцентные параметры: квантовый выход флуоресценции, эффективность (квантовый выход) переноса энергии с остатков тирозина на остаток триптофана (γ), а также отношение интенсивности флуоресценции при разных длинах волн (I_{320} и I_{355}), отражающее положение и форму спектра и позволяющее идентифицировать очень малые (до 0,5 нм) спектральные сдвиги [15].

Изменение флуоресцентных параметров под влиянием рН может отражать как эффекты ионизации функциональных групп, локализованных непосредственно в окружении остатка триптофана, так и конформационные перестройки, затрагивающие это окружение. В интервале рН от 9,0 до 12,0 (рис. 3) резко уменьшается квантовый выход (кривая 1) и эффективность переноса энергии (кривая 2), сопровождаемые значительным сдвигом спектров в длинноволновую сторону (до 350 нм, кривая 3), что, по-видимому, связано с щелочной денатурацией молекулы белка (середины перехода при рН 10,6). Уменьшение квантового выхода и эффективности переноса энергии, вероятно, вызвано в значительной степени ионизацией фенольных групп остатков тирозина и появлением ионов тирозината, что может приводить к тушению триптофаниловой флуоресценции в ре-

зультате эффективного переноса энергии с остатка триптофана на тирозинат [16] и эффекта экранировки возбуждения [17]; на рис. 3 (кривая 2) последний эффект учтен. Таким образом, полученные данные показывают, что изменения параметров флуоресценции в щелочной области рН отражают суммарный эффект нескольких процессов.

Очень высокая величина квантового выхода тирозил-триптофанилового переноса энергии (70%) в нейтральной зоне рН свидетельствует о том, что на остаток триптофана может мигрировать энергия, поглощаемая большинством из 11 остатков тирозина, имеющих в белке. Для этого необходимо, чтобы в непосредственной близости к индолному кольцу (на расстоянии $< 7-8 \text{ \AA}$) находилось не менее 8 остатков тирозина или, что более вероятно, хотя бы один фенольный хромофор (между ним и остальными остатками тирозина возможен очень высокоэффективный обмен энергией возбуждения). Это означает, что каждая из донорных фенольных групп должна находиться на расстоянии не более $5-6 \text{ \AA}$ от любой другой донорной фенольной группы этой системы. Это, естественно, должно способствовать и высокой эффективности переноса энергии с остатка триптофана на ионы тирозината в щелочной среде. Для РНКазы T_1 , имеющей довольно высокий уровень тирозил-триптофанилового переноса энергии (табл. 1), установлено, что два остатка тирозина (56 и 57) расположены достаточно близко к остатку триптофана 59 [18].

Ранее на основании результатов спектрофотометрического титрования и модификации тетранитрометаном было установлено, что из 11 остатков тирозина РНКазы S_2 два локализованы на поверхности молекулы [4]. Анализ зависимости от рН квантового выхода триптофаниловой флуоресценции и эффективности переноса энергии с остатков тирозина на триптофан (середины переходов при рН 10,4 и 10,2 соответственно) позволяет предположить, что наблюдаемые в щелочной области (до рН 10,0) изменения этих параметров флуоресценции обусловлены в основном ионизацией поверхностных остатков тирозина.

В кислой области (рН $< 6,0$) происходит значительное уменьшение квантового выхода, вызванное, по-видимому, тушением триптофаниловой флуоресценции протонированными карбоксильными группами [19—22]. Однако положение и форма спектров в этой области рН практически не изменяются, и это свидетельствует об отсутствии денатурационных изменений в области, окружающей остаток триптофана. В то же время приведенные выше факты указывают на то, что расположенный внутри глобулы белка индолный хромофор находится в контакте с карбоксильной или с какой-либо иной полярной группой, меняющей свои свойства при ионизации карбоксила.

Наряду с уменьшением квантового выхода в кислой области рН увеличивается (на $\sim 20\%$) эффективность тирозил-триптофанилового переноса энергии (рис. 3, 2), что также, вероятно, связано с протонированием карбоксильных групп.

Известно, что заряженная форма карбоксильной группы, будучи акцептором гидроксильного протона возбужденного хромофора, эффективно тушит тирозиловую флуоресценцию [23]. При протонировании COO^- -группы эффект тушения тирозиловой флуоресценции снижается. Это может привести к упомянутому выше увеличению эффективности переноса энергии с остатков тирозина на триптофан в РНКазе S_2 .

В случае денатурационного разворачивания белковой структуры может увеличиваться расстояние между донорами и акцепторами энергии и, следовательно, снижаться тирозил-триптофаниловый перенос энергии. Наблюдаемый же ход эффективности переноса энергии при рН $< 6,0$ может свидетельствовать об отсутствии денатурационных изменений не только в непосредственном окружении индольного кольца, но и во всех хромофорах остатков тирозина и триптофана, в пределах которых происходит перенос энергии.

Небольшое уменьшение квантового выхода в интервале рН от 8,5 до 7,5, вероятно, связано с ионизацией имидазольного кольца одного из остатков гистидина. Можно предположить, что одна из имидазольных групп РНКазы С₂ ионизируется с аномально высоким (~8) значением рК. Правомерность такого предположения подтверждается наличием имидазольной группы с рК 7,5 [24—26] или 8,0 [27] в РНКазе Т₁ и значительным сходством рН-зависимости фотоокисления остатков гистидина в РНКазах С₂ [3] и Т₁ [24]. Не исключено, однако, что этот эффект связан с протонированием N-концевой α-аминогруппы [28], которое может привести к перераспределению зарядов функциональных групп в окружении остатка триптофана и, таким образом, индуцировать конформационную перестройку в этом участке структуры белка.

При рН от 7,5 до 6,0 наблюдается значительное (до 30%) увеличение квантового выхода, сопровождаемое небольшим (до 0,5 нм) коротковолновым сдвигом спектра; форма спектра при этом не изменяется. Эти изменения флуоресцентных параметров вызваны скорее всего протонированием имидазольных колец одного или двух остатков гистидина (рК ~6,5) из трех имеющихся в молекуле РНКазы С₂. Увеличение выхода и коротковолновый сдвиг спектров свидетельствуют об изменении свойств области окружения остатка триптофана: некотором увеличении жесткости этого окружения и ослаблении влияния соседних тушащих полярных групп. Поскольку имидазол в катионной форме является намного более сильным тушителем, чем в нейтральной [29], правомерно предположить, что изменение заряда имидазолов одного или двух остатков гистидина приводит к рН-индуцируемой конформационной перестройке в этом участке структуры, которая и находит отражение в изменении флуоресцентных свойств.

Анализ полученных данных о влиянии изменения рН на флуоресцентные параметры РНКазы С₂ позволяет предположить, что в области окружения остатка триптофана локализованы по меньшей мере одна карбоксильная группа с рК 4,0—4,5 и, по-видимому, одна имидазольная группа с аномально высоким значением рК. Тушение триптофаниловой флуоресценции в щелочной области (рН 9,0—10,5) вызвано, вероятно, ионизацией двух поверхностных остатков тирозина; середина перехода щелочной денатурации приблизительно равна 10,6. В кислой зоне рН в области локализации остатка триптофана и нескольких остатков тирозина отсутствуют конформационные изменения, характерные для кислотной денатурации. При рН 6,0—7,5 имеет место конформационная перестройка, вызывающая некоторое уменьшение подвижности и полярности области, окружающей остаток триптофана. При физиологических значениях рН (6,0—9,0) часть энергии, поглощенной остатками тирозина, инактивируется в результате взаимодействия с ионами карбоксилата (за счет образования H-связанных комплексов или в ходе взаимодействия в возбужденном состоянии), что несколько снижает выход переноса энергии. Поскольку большинство остатков тирозина РНКазы С₂ титруется с аномально высокими значениями рК [4], можно предположить, что роль тушащих комплексов достаточно велика, особенно для фенольных групп остатков тирозина, локализованных в гидрофобной области молекулы [30, 31]. Два остатка тирозина с нормальными значениями рК ионизации [4], вероятнее всего, расположены вблизи остатка триптофана.

Для более детального исследования рН-индуцируемой конформационной перестройки в области, окружающей остаток триптофана, было изучено действие некоторых физико-химических факторов (температура, ионные тушители, диоксан и КСl) на флуоресцентные параметры РНКазы С₂ при рН 6,0 и 8,0, т. е. в постулируемых разных конформационных состояниях фермента.

Увеличение концентрации КСl от 0,025 до 0,15 М приводит к некоторому возрастанию (на 7—9%) квантового выхода при обоих значениях рН, а при рН 8,0, кроме того, наблюдается коротковолновый сдвиг спектров

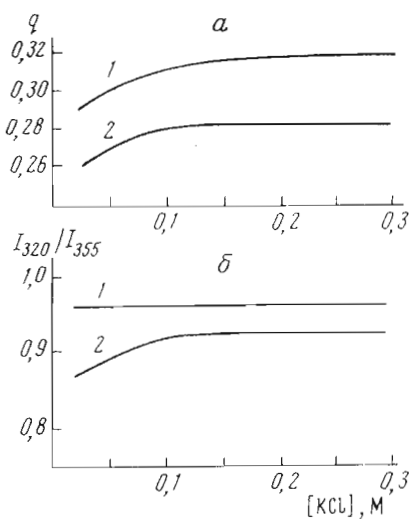


Рис. 4

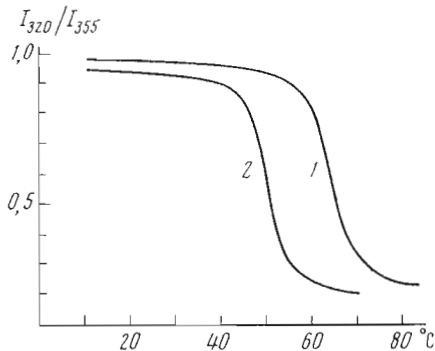


Рис. 6

(рис. 4). Дальнейшее повышение концентрации KCl (до 0,3 М) существенно не влияет на параметры флуоресценции. Аналогичные результаты были получены также и при λ_B 280,4 нм. Все это позволяет предположить, что наблюдаемое увеличение квантового выхода флуоресценции вызвано изменением локального окружения индольного хромофора, а коротковолновый сдвиг спектров при pH 8,0 свидетельствует об уменьшении подвижности этой области. Возможно также, что область, окружающая остаток триптофана РНКазы S_2 , при pH 6,0 обладает большей жесткостью, чем при pH 8,0. Не исключено, что наблюдаемые эффекты обусловлены экранировкой электролитом близлежащих заряженных групп. Концентрация KCl, равная 0,15 М, при которой наблюдается стабилизация флуоресцентных параметров, оптимальна и для каталитической активности РНКазы S_2 [7].

С целью изучения влияния конформационной перестройки на доступность остатка триптофана растворителю было проведено тушение флуоресценции РНКазы S_2 ионами CsCl и KI при различных pH и для сравнения тушение ионами Cs⁺ и I⁻ флуоресценции РНКазы T_1 при pH 6,0 (табл. 2). Использование разноименно заряженных ионных тушителей позволяет определить локализацию (на поверхности или внутри глобулы) остатков триптофана в исследуемых белках и оценить наличие электроста-

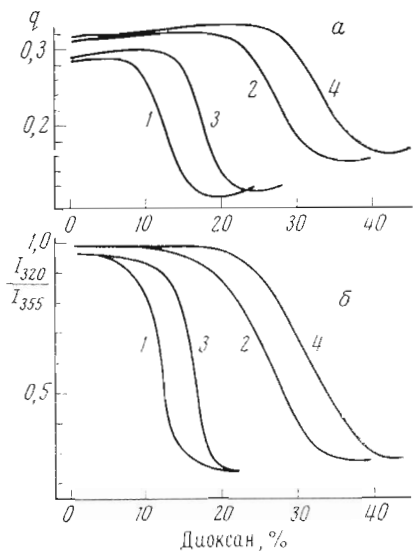


Рис. 5

Рис. 4. Влияние KCl на квантовый выход (а) и положение спектров (б) РНКазы S_2 (λ_B 296,7 нм) при pH 6,0 (1) и 8,0 (2)

Рис. 5. Влияние диосгена на квантовый выход (а) и положение спектров (б) РНКазы S_2 (λ_B 296,7 нм) при pH 6,0 и 8,0. Фермент + диосген: pH 8,0 — 1, pH 6,0 — 2; фермент + диосген + 0,15 KCl: pH 8,0 — 3, pH 6,0 — 4

Рис. 6. Влияние температуры на положение спектров РНКазы S_2 (λ_B 296,7 нм) при pH 6,0 (1) и 8,0 (2)

Тушение флуоресценции РНКаз C_2 и T_1 йодидом (I^-)

РНКазы	pH	$q_{296,7}$	$K_{SV}^* M^{-1}$	L	РНКазы	pH	$q_{296,7}$	$K_{SV}^* M^{-1}$	L
C_2	4,0	0,24	0,517	0,04	C_2	8,0	0,28	0,290	0,02
C_2	6,0	0,32	0,517	0,03	T_1	6,0	0,45	0,550	0,02

* K_{SV} — константа Штерна — Фольмера [6].

тического заряда и его знака в локальном окружении индольного хромофора [6, 32].

Положительно заряженный ион Cs^+ при концентрациях до 0,3 М не влиял на квантовый выход триптофановой флуоресценции РНКаз C_2 и T_1 при pH 4,0—8,0, что еще раз подтверждает сделанный ранее вывод о локализации остатков триптофана в недоступных воде участках молекул этих ферментов.

Тушение флуоресценции ионом йода при pH 6,0 (табл. 2) выражено очень слабо. Доступность остатка триптофана этому иону составляла лишь 2—4% от доступности свободного триптофана. Полная недоступность остатков триптофана РНКаз C_2 и T_1 катионному тушителю Cs^+ и малая, но определенная доступность аниону I^- , возможно, связаны с наличием положительного заряда на поверхности глобулы, вблизи от индольного хромофора. При изменении pH раствора РНКазы C_2 от 8,0 до 4,0 доступность (I^-) триптофанового остатка йодиду (I^-) увеличивается от 0,02 до 0,04. Абсолютные значения этих величин указывают на то, что единственный остаток триптофана фермента в этом диапазоне pH почти недоступен молекулам растворителя. Небольшая доступность этого остатка, очевидно, связана с подвижностью участка белковой структуры, отделяющей хромофор от поверхности глобулы *. Относительные изменения величины L, возможно, отражают изменение знака заряда глобулы при изменении pH.

Исследование влияния диоксана на параметры флуоресценции РНКазы C_2 (рис. 5) показало, что при pH 8,0 его добавление до концентрации 12—15% приводит к резкому уменьшению квантового выхода и значительному длинноволновому сдвигу спектров, свидетельствующих об изменении в области окружения остатка триптофана. При pH 6,0 аналогичные изменения параметров флуоресценции наблюдаются лишь при более высоких концентрациях диоксана (25—27%).

Определенные изменения стабильности белковой структуры могут быть также вызваны перестройкой системы водородных связей и электростатических взаимодействий на поверхности глобулы без конформационной перестройки. Однако в случае РНКазы C_2 в диапазоне pH 6,0—8,0 титруется не более 4 ионогенных групп (3 имидазольные и 1 α -аминая), поэтому вряд ли этот фактор определяет изменение денатурирующей концентрации диоксана вдвое. Столь большое изменение стабильности можно объяснить лишь pH-индуцируемой структурной перестройкой, которую уже можно было предполагать на основании данных зависимости квантового выхода флуоресценции от pH.

Добавление в раствор РНКазы C_2 помимо диоксана 0,15 М KCl заметно повышало стабильность структуры фермента при обоих значениях pH, сдвигая индуцируемый диоксаном переход в сторону его более высоких концентраций. Эти данные находятся в хорошем соответствии с описанными выше результатами влияния ионной силы на структуру области, окружающей в РНКазе C_2 остаток триптофана.

* Личное сообщение д-ра К. А. Гирона (США, Миссурийский университет).

Для изучения температурно-индуцируемых конформационных переходов в качестве параметра флуоресценции, отражающего структурные изменения, было использовано отношение интенсивности флуоресценции при 320 и 355 нм. Для белков, содержащих один остаток триптофана, резкое изменение этого параметра является достаточным критерием, свидетельствующим о перестройках при действии температуры. Этот параметр к тому же не искажается фоном температурного тушения. И в этом случае в значительной степени проявляются структурные различия при разных значениях рН (рис. 6). Температура денатурационного перехода при рН 6,0 и 8,0 различается более чем на 10° и равна $64 \pm 1^\circ$ и $50 \pm 1^\circ$ соответственно, и это нельзя объяснить, не предположив, что изменяется структура белка.

Таким образом, совокупность полученных результатов служит вполне убедительным доказательством существования рН-индуцируемой (рН 6,0—8,0) конформационной перестройки, которая изменяет физические свойства участка, окружающего в РНКазе C_2 остаток триптофана. Эти изменения свидетельствуют о более жесткой и стабильной упаковке этого участка при рН 6,0. Не исключено, что описанные локальные конформационные изменения, индуцируемые различными физико-химическими факторами, затрагивают третичную структуру всей молекулы РНКазы C_2 и влияют на ее каталитические функции. Для выяснения этого вопроса необходимы дополнительные исследования с помощью методов, позволяющих регистрировать изменения конформации молекулы в целом.

В данной работе уже обсуждалось возможное сходство в локализации остатков триптофана у РНКаз C_2 и T_1 . Однако флуоресценция РНКазы T_1 в настоящее время изучена пока еще недостаточно. Имеющиеся данные [11—14, 33] носят фрагментарный характер. Это в значительной степени затрудняет сравнительный анализ флуоресценции исследованных в настоящей работе РНКаз и подобных им ферментов.

Экспериментальная часть

РНКазу C_2 получали по методу, описанному ранее [1]. Препарат РНКазы T_1 («Worthington», США) любезно предоставлен д-ром К. А. Гиром (США).

Использованные для приготовления растворов трис («Serva», ФРГ), мочевины, KCl, CsCl, KI (отечественного производства, квалификации х. ч. или ос. ч.) дополнительно очищали перекристаллизацией. В качестве растворителей применяли диоксан («Fluka», Швейцария) и бидистиллированную воду.

Спектры поглощения записывали с помощью регистрирующего спектрофотометра «Spectord UV-Vis» (ГДР). Измерения спектров флуоресценции проводили на установке с монохроматическим облучением в термостатированной (25°) кварцевой кювете при возбуждении светом ртутных линий от лампы СВД-120А при $280,4 \pm 0,3$ и $296,7 \pm 0,1$ нм [6]. При обработке спектров вводили поправку на спектральную чувствительность установки. С учетом поправки интенсивность флуоресценции была пропорциональна числу фотонов на единицу интервала длин волн. Для поправки спектров на экранировку тирозинатом использовали выражение [17]

$$W = \frac{1 - T_{\text{Трп}}}{1 - T_{\text{Трп}} \cdot T_{\text{Тыр}}} \cdot \frac{D_{\text{Трп}} + D_{\text{Тыр}}}{D_{\text{Трп}}},$$

где T и D — пропускание и оптическое поглощение триптофана и тирозина соответственно ($T = 10^{-D}$) при длине волны возбуждения 296,7 нм.

Воспроизводимость интенсивности флуоресценции была не выше 3%. Зависимость интенсивности флуоресценции от температуры регистрировали на установке, описанной в работе Бусела и др. [34].

Абсолютные значения квантовых выходов определяли сравнительным методом [35], принимая квантовый выход триптофана в нейтральных водных растворах равным 0,2 [36]. Отношение интенсивностей при 320 и 355 нм рассчитывали без введения поправки на спектральную чувствительность установки. Для расчета эффективности (квантового выхода) переноса энергии γ (γ — доля квантов света, поглощенных остатками тирозина и перенесенных на остаток триптофана) использовали выражение [37]

$$\gamma = \frac{q_{280}^{\text{Трп}} - q_0^{\text{Трп}} \cdot f_{280}^{\text{Трп}}}{q_0^{\text{Трп}} \cdot f_{280}^{\text{Тыр}}},$$

где $q_{280}^{\text{Трп}}$ — квантовый выход триптофаниловой флуоресценции белка, возбуждаемой при длине волны 280 нм, при которой поглощает и тирозин; $q_0^{\text{Трп}}$ — квантовый выход флуоресценции белка, возбуждаемой в области, в которой поглощает лишь триптофан (> 295 нм); $f_{280}^{\text{Трп}}$ и $f_{280}^{\text{Тыр}}$ — вклады триптофана и тирозина в оптическую плотность белка при 280 нм.

Растворы РНКазы S_2 готовили, растворяя фермент в 0,01 М трис-ацетатном или трис-НСI-буфере с добавлением 0,05 М КСI. Необходимые значения рН устанавливали с помощью 0,1 н. НСI или КОН (рН-метр рН-340), разбавление растворов фермента при этом не превышало 2%. РНКазу T_1 растворяли в 0,1 М сульфате аммония при рН 6,0. Все растворы ферментов имели оптическую плотность $0,4 \pm 0,1$ при 278 нм; концентрацию белка рассчитывали по оптической плотности при 279 нм, принимая $E_{1\text{ см}}^{0,1\%} = 1,91$ для РНКазы T_1 [26] и 1,93 для РНКазы S_2 .

Растворы ферментов, используемые для тушения, готовили следующим образом: к раствору фермента в соответствующем буфере добавляли растворы CsCl или KI до конечной концентрации 0,1—0,3 М. Общую концентрацию солей в растворе, равную 0,3 М, поддерживали добавлением необходимого количества КСI.

Параметр L , отражающий величину доступности хромофора тушителю в белке по отношению к доступности свободного триптофана, определяли из уравнения [5]

$$L = \frac{K_{\text{белка}}}{K_{\text{Трп}}} \cdot \frac{q_{\text{Трп}}}{q_{\text{белка}}},$$

где $K_{\text{Трп}}$ и $K_{\text{белка}}$ — константы Штерна — Фольмера для свободного триптофана в воде и триптофанового остатка белка; $q_{\text{Трп}}$ и $q_{\text{белка}}$ — квантовые выходы свободного триптофана и остатка триптофана белка.

Все экспериментальные данные являются средними из 10—12 измерений.

Авторы выражают искреннюю признательность О. М. Жереловой (Институт биологической физики АН СССР) за большую помощь в проведении этой работы, а также д-ру К. А. Гируну (С. А. Ghiron, University of Missouri, Columbia, USA) за предоставление препарата РНКазы T_1 .

ЛИТЕРАТУРА

1. Морозова В. Г., Грищенко В. М., Безбородова С. И. (1972) Изв. АН СССР. Сер. биол. н., 865—871.
2. Безбородова С. И. (1974) в сб. Нуклеазы микроорганизмов (под ред. Безбородова А. М.) с. 188—259, «Наука» М.
3. Грищенко В. М., Белецкая О. П., Безбородова С. И. (1975) Биоорган. химия, 1, 1474—1480.
4. Белецкая О. П., Грищенко В. М., Безбородова С. И. (1974) Тезисы докладов III Всесоюзного симпозиума по химии пептидов и белков, с. 19, Киев.
5. Бурштейн Э. А. (1973) в сб. Молекулярная биология (Итоги науки и техники, ВИНТИ АН СССР), т. 3, с. 127—215, ВИНТИ, М.
6. Burstein E. A., Vedenkina N. S., Ivkova M. N. (1973) Photochem. Photobiol., 18, 263—279.

7. Морозова В. Г., Безбородова С. И. (1973) Научн. докл. Высш. школы, Биол. н., 100—105.
8. Longworth J. W. (1971) in *Excited states of proteins and nucleic acid* (Steiner R. F., Weinryb I., eds), pp. 319—384, Plenum Press, N. Y.
9. Homer O. B. (1972) *Biochim. et biophys. acta*, **278**, 395—398.
10. Бурштейн Э. А. (1975) Тезисы докладов симпозиума по химии и биохимии белков и пептидов, с. 6, Ташкент.
11. Longworth J. W. (1968) *Photochem. Photobiol.*, **7**, 587—596.
12. Yamamoto Y., Tanaka J. (1970) *Biochim. et biophys. acta*, **207**, 522—531.
13. Pongs O. (1970) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **38**, 431—437.
14. Pongs O. (1970) *Biochemistry*, **9**, 2316—2321.
15. Черницкий Е. А. (1972) Люминесценция и структурная лабильность белков в растворе и клетке, с. 220—222, «Наука и техника», Минск.
16. Steinberg I. Z. (1971) *Annual. Rev. Biochem.*, **40**, 83—160.
17. Бурштейн Э. А. (1968) *Биофизика*, **13**, 433—441.
18. Takahashi K. (1971) *J. Biochem.*, **70**, 945—960.
19. Cowgill R. W. (1963) *Biochim. et biophys. acta*, **75**, 272—273.
20. White A. (1959) *Biochem. J.*, **71**, 217—220.
21. Fasman G. D., Badenheimer E., Pesce A. (1966) *J. Biol. Chem.*, **241**, 916—923.
22. Владимирюв Ю. А., Ли Чинь-го (1962) *Биофизика*, **7**, 270—280.
23. Weber G., Woid F. (1963) *Fed. Proc.*, **22**, 348.
24. Irie M. (1970) *J. Biochem.*, **68**, 69—79.
25. Takahashi K. (1971) *J. Biochem.*, **69**, 331—338.
26. Iida S., Ooi T. (1969) *Biochemistry*, **8**, 3897—3901.
27. Rüterjans H., Pongs O. (1970) *Eur. J. Biochem.*, **18**, 313—318.
28. Бусел Е. П. (1973) в сб. *Молекулярная биология (Итоги науки и техники, ВИНТИ АН СССР)*, т. 3, с. 85—126, ВИНТИ, М.
29. Bushueva T. L., Busel E. P., Bushuev V. N., Burstein E. A. (1974) *Stud. Biophys.*, **44**, 129—139.
30. Teale F. W. J. (1960) *Biochem. J.*, **76**, 381—388.
31. Moon A. Y., Poland D. C., Sheraga H. A. (1965) *J. Phys. Chem.*, **69**, 2960—2966.
32. Веденкина Н. С., Буколова Т. Г., Ивкова М. Н., Бурштейн Э. А. (1971) *Молекулярная биология*, **5**, 809—816.
33. Irie M. (1970) *J. Biochem.*, **68**, 31—37.
34. Бусел Е. П., Бушуева Т. Л., Бурштейн Э. А. (1970) *Ж. опт. и спектроск.*, **29**, 501—507.
35. Parker C. A., Rees W. F. (1960) *Analyst*, **85**, 587—600.
36. Teale F. W. J., Weber G. (1957) *Biochem. J.*, **65**, 476—482.
37. Kronman M. J., Holmes L. G. (1971) *Photochem. Photobiol.*, **14**, 113—134.

Поступила в редакцию
18.VII.1975

EXTRACELLULAR RIBONUCLEASE C₂ FROM *ASP. CLAVATUS*. II. FLUORESCENCE SPECTROSCOPY STUDY OF STRUCTURAL STATES

GRISCHENKO V. M., EMELYANENKO, V. I., IVKOVA M. N.,
BEZBORODOVA S. I., BURSTEIN E. A.

*Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms
and Institute of Biological Physics, Academy of Sciences
of the USSR, Pushchino*

For RNase C₂ and RNase T₁ an analysis of the fluorescence spectra parameters and of fluorescence quenching by Cs⁺ and I⁻ ions suggested the location of the single tryptophan residue of these enzymes within rigid environment of low polarity. The study of pH effects on fluorescence quantum yield, spectrum position and the efficiency of tyrosine-tryptophan energy transfer revealed the location of carboxyl, imidazole and phenole groups in the tryptophan environment of RNase C₂. A conformational change that alters the structural and physical properties of indole chromophore environment was shown to take place and was assigned to the ionization of neighbouring imidazole and/or carboxyl groups. The effects of temperature, KCl and dioxan concentration on fluorescence quantum yield and spectrum position of RNase C₂ at pH 6.0 and 8.0 were also indicative of a conformational transition.