



УДК 547.963.32

**ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ БЕЛКА ВИРУСА ТАБАЧНОЙ МОЗАИКИ
С СИНТЕТИЧЕСКИМИ ПОЛИНУКЛЕОТИДАМИ,
СОДЕРЖАЩИМИ ФЛЮОРЕСЦЕНТНУЮ МЕТКУ**
II. ПЕРЕНОС ЭНЕРГИИ С ТРИПТОФАНОВОГО
НА 1, N⁶-ЭТЕНОАДЕНИНОВЫЕ ОСТАТКИ POLY(A, εA)
В РИБОНУКЛЕОПРОТЕИДЕ

Леднеза Р. К., Разживин А. П., Богданов А. А.

*Межфакультетская проблемная научно-исследовательская лаборатория
молекулярной биологии и биоорганической химии им. А. Н. Белозерского
Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова*

Кост А. А., Златкин И. В.

Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина Академии наук СССР, Москва

Показано, что взаимодействие белка вируса табачной мозаики с сополимерами адениловой и 1, N⁶-этенoadениловой кислот с низким и средним содержанием этеноадениловых звеньев приводит к образованию вирусоподобных рибонуклеопротеидов. Анализ спектров испускания и возбуждения флуоресценции свидетельствует о переносе энергии возбуждения с триптофановых на этеноаденилиновые остатки в рибонуклеопротеиде. Измерения тушения триптофановой и разгорания этеноаденилиновой флуоресценции позволили оценить расстояние между одним из триптофановых остатков белка вируса табачной мозаики и этеноаденилиновыми остатками полинуклеотида в рибонуклеопротеиде в $17 \pm 2 \text{ \AA}$.

Реконструкция рибонуклеопротеидных комплексов на основе синтетических полинуклеотидов является одним из подходов к изучению нуклеино-белкового взаимодействия. Возможности такого рода исследований могут быть расширены при использовании полинуклеотидов, содержащих репортерные группы.

В настоящей работе показано взаимодействие белка вируса табачной мозаики с сополимерами адениловой и этеноадениловой кислот, характеризующимися низким и средним содержанием этеноаденилиновых звеньев, исследованы флуоресцентные свойства комплексов и сделаны некоторые выводы об их структуре. Структура и оптические свойства сополимеров poly(A, εA) описаны в предшествующей статье [1].

Как было показано ранее [2, 3], образование вирусоподобной частицы из белка вируса табачной мозаики и poly(A) сопровождается увеличением амплитуды спектров КД в области 260–295 нм, достигающим максимального значения при 276–277 нм. В связи с этим в настоящей работе для регистрации образования комплексов использовали метод КД; дополнительную независимую информацию о комплексообразовании получали с помощью метода флуоресценции. Неаддитивность спектров КД и флуоресценции была обнаружена для смесей белка и poly(A, εA) низкой и средней

Измерения флуоресценции и КД смесей сополимеров poly(A, εA)
с белком вируса табачной мозаики

Полинуклеотид	Концентрация ^{1*} , М·10 ⁵		Измерения КД		Флуоресцентные измерения				
	Белок	P _i	$\Delta(D_L - D_R)_{275} \cdot 10^6$	Степень комплексообразования	$I_{TGr}^{poly(A, \epsilon A)}$	$I_{TGr}^{poly(A)}$	d ^{2*}	a ^{3*}	f ^{3*}
Poly(A)	2,0	5,1	47	95±5%	1,00	—	—	—	—
Poly(A ₉₃ , εA ₇)	2,0	5,2	47	85±10%	0,96±0,03	0,60	1,39	0,83	—
Poly(A ₆₂ , εA ₃₈)	2,0	6,1	14	40±10%	0,78±0,03	0,40	4,03	0,71	—
Poly(A ₅₃ , εA ₁₇)	2,0	6,1	9,5	32±10%	0,87±0,03	0,46	3,84	0,73	—
Poly(A ₄₅ , εA ₅₅)	2,0	6,0	6,0	22±10%	0,92±0,05	0,45	3,70	0,64	—
Poly(A ₁₀ , εA ₉₀)	2,0	6,1	0	0	—	—	—	—	—

^{1*} Для флуоресцентных измерений все образцы разводили в 10 раз.

^{2*} Параметр из уравнения (1).

^{3*} Параметр из уравнения (3).

степени модификации. Разностный спектр КД в области 260–295 нм по форме походил на разностный спектр, появляющийся при взаимодействии белка вируса табачной мозаики с poly(A), однако амплитуда в максимуме была тем ниже, чем выше содержание остатков этеноаденина в полинуклеотиде (рис. 1). Изучение спектров флуоресценции тех же образцов обнаружило тушение флуоресценции белка и разгорание этеноадениновой полосы флуоресценции. В случае poly(A₁₀, εA₉₀) спектры КД и флуоресценции смеси были полностью аддитивны, что свидетельствовало об отсутствии взаимодействия белка вируса с высокомодифицированным полинуклеотидом. Полученные данные приводят к выводу, что эффективность комплексообразования падает с увеличением степени модификации poly(A). В то же время аналогия спектральных эффектов, сопровождающих включение poly(A) и poly(A, εA) в комплекс, указывает на сохранение общего характера взаимодействия остатков адениловой и этеноадениловой кислот модифицированного полинуклеотида с белком вируса табачной мозаики. Отсутствие каких-либо спектральных изменений в смесях белка с poly(A₁₀, εA₉₀) также убеждает в том, что взаимодействие компонентов в комплексах белка вируса с poly(A, εA) низкой и средней степени модификации специфично. Пользуясь ранее определенным для рибонуклеопротеида (РНП), содержащего poly(A), разностным коэффициентом молярной экстинкции КД, $\Delta(\Delta\epsilon)_{275} = 10,3 \pm 0,6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [3], можно оценить концентрацию комплексов в смесях белка и сополимеров по степени включения остатков адениловой кислоты в комплекс (таблица).

Дополнительное доказательство специфичности взаимодействия белка вируса с модифицированной poly(A) было получено при изучении некоторых свойств индивидуального РНП, содержащего poly(A₉₃, εA₇). Этот РНП выделяли из реакционной смеси ультрацентрифугированием. Он имел коэффициент седиментации ~105S подобно комплексу, реконструированному с участием poly(A). Электроно-микроскопические исследования, выполненные в Институте кристаллографии АН СССР А. С. Кафтаевой, не обнаружили никаких различий в структуре РНП, содержащих poly(A) и poly(A₉₃, εA₇). Изучение КД показало (рис. 2), что форма спектра КД этих двух частиц в области 250–300 нм одинакова, но для РНП, содержащего модифицированный полинуклеотид, амплитуда в максимуме (271 нм) несколько ниже: $[\theta]_{\text{макс}} = 66000 \pm 2000$ и 61000 ± 1000 для РНП с poly(A) и poly(A₉₃, εA₇) соответственно. Разностные спектры КД, полученные вы-

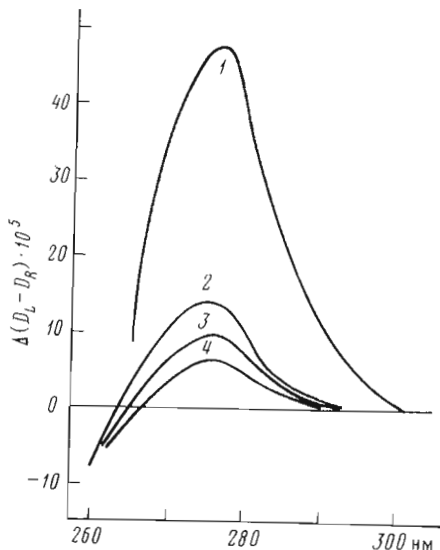


Рис. 1

Рис. 1. Разностные спектры КД, появляющиеся при взаимодействии белка вируса табачной мозаики с poly(A) и poly(A₉₃, εA₇) (1), poly(A₆₂, εA₃₈) (2), poly(A₅₃, εA₁₇) (3) и poly(A₄₅, εA₅₅) (4) в 0,1 М фосфатном буфере, pH 6,6. Концентрации компонентов и степени комплексообразования указаны в таблице

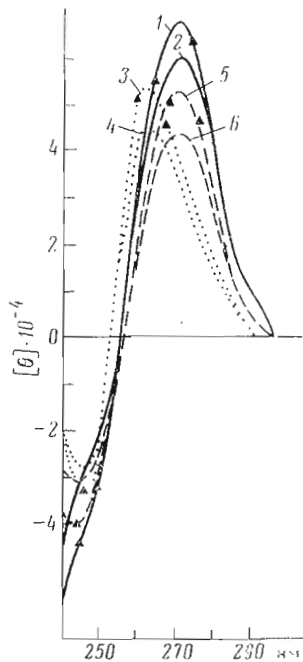


Рис. 2

Рис. 2. Спектры КД РНП, включающего poly(A) (1), РНП с poly(A₉₃, εA₇) (2) и соответствующих полинуклеотидов в свободной форме (3, 4) и в составе РНП (5, 6). Концентрация полинуклеотида (P_i) vsюду 4,1 · 10⁻⁵ М; концентрация белка в РНП с poly(A) 290 и в РНП с poly(A₉₃, εA₇) 324 мкг/мл. Спектры измерены в 0,1 М фосфатном буфере, pH 5,5 (1, 2) и 7,2 (3, 4)

читанием спектра реполимеризованной формы белка (структурно аналогичной белковой оболочке вируса) из спектра РНП и характеризующие вторичную структуру полинуклеотидов в комплексе, аналогичны по форме и различаются лишь величиной амплитуды: $[\theta]_{\text{макс}}$ связанной формы poly(A) и ее аналога составляет соответственно 53200 ± 2000 и 43500 ± 1000 . Как видно из сравнения спектров КД свободной и связанной форм полинуклеотидов, включение в РНП сопровождается одинаковым красным сдвигом максимума первой положительной полосы КД от 262 до 270 нм, величина амплитуды при этом практически не изменяется ($[\theta]_{262} = 53500 \pm 1000$ для poly(A) и 44800 ± 1000 для poly(A₉₃, εA₇)). Меньшая интенсивность первой полосы КД связанной формы poly(A₉₃, εA₇) и соответствующего РНП в сравнении с таковым для poly(A) объясняется более низким собственным дихроизмом модифицированного полинуклеотида.

Совокупность полученных данных приводит к выводу, что замена адениновых остатков poly(A) этеноадениновыми неблагоприятно сказывается на способности полинуклеотида взаимодействовать с белком вируса табачной мозаики. Однако для полимеров даже средней степени модификации стерические препятствия, создаваемые этеногруппой, частично преодолеваются за счет кооперативного взаимодействия белка с остатками адениловой кислоты и введение этеноаденинового основания в область белка, осуществляющую связывание гетероциклических оснований, не искажает структуры образующихся комплексов.

Изучение спектров флуоресценции РНП и составляющих его компонентов выявило тушение флуоресценции белка и разгорание флуоресценции

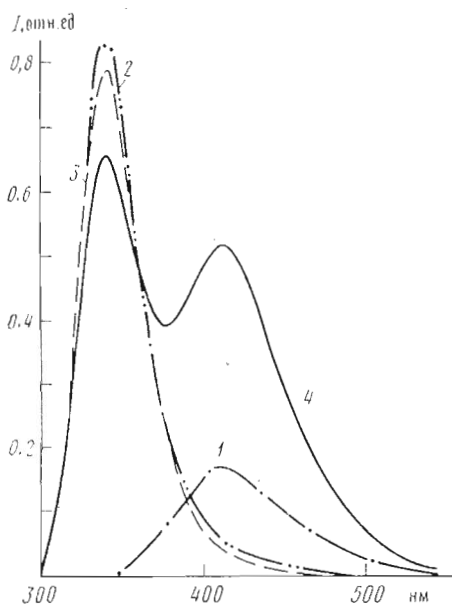


Рис. 3

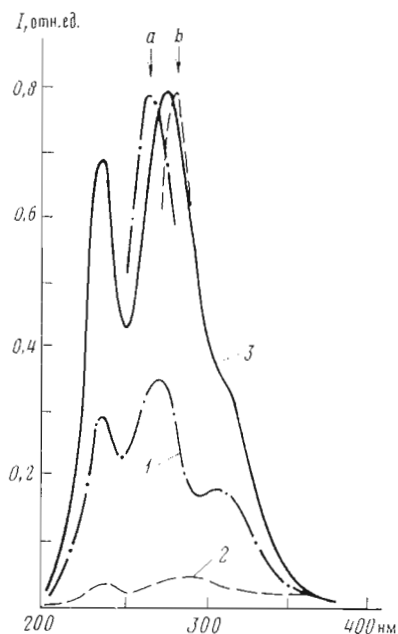


Рис. 4

Рис. 3. Некорректированные спектры испускания флуоресценции сополимера poly(A, εA) (1), белка вируса табачной мозаики (2), смеси белка вируса с poly(A) (3) и с poly(A, εA) (4) в 0,1 М фосфатном буфере (pH 6,6) при 20°, λ_{возб} 285 нм. Препараты имеют одинаковую концентрацию по белку и по фосфору; степень модификации poly(A, εA) равна 0,38

Рис. 4. Некорректированные спектры возбуждения флуоресценции poly(A, εA) (1), смеси белка вируса табачной мозаики с poly(A) (2) и с poly(A₆₂, εA₃₈) (3) в 0,1 М фосфатном буфере (pH 6,6) при 20°; λ_{флуор} 410 нм. Препараты имели одинаковую концентрацию по белку и по фосфору. Для сравнения приведены положения максимумов спектров возбуждения poly(A₆₂, εA₃₈) (а) и смеси белка с poly(A) (б), снятые при повышенной чувствительности спектрофлуориметра

этионаденинового остатка в комплексе, что аналогично изменениям, обнаруженным на смесях белка вируса с poly(A, εA). Поскольку, однако, методически значительно проще работать со смесями, а не с выделенными из них комплексами, основное изучение флуоресцентных свойств компонентов и их изменений при комплексообразовании проводили на смесях белка с poly(A, εA).

Спектры флуоресценции белка вируса табачной мозаики, poly(A₆₂, εA₃₈) и их смеси, снятые при возбуждении в 285 нм, приведены на рис. 3. Для сравнения приведен также спектр испускания флуоресценции смеси белка с poly(A). Как видно из рисунка, включение poly(A) в комплекс сопровождается уменьшением интенсивности флуоресценции белка на 5–10%, обусловленным свечением триптофановых остатков [4]. Подобное изменение отмечали ранее при сравнении спектров флуоресценции целого вируса и реполимеризованного белка (pH 6,6) [4]. Для смеси белка вируса табачной мозаики poly(A₆₂, εA₃₈), концентрация комплекса в которой оценивается в 40±10%, наблюдается более сильное тушение флуоресценции белка и значительное увеличение (разгорание) интенсивности этионадениновой полосы в сравнении с интенсивностью флуоресценции свободной формы poly(A₆₂, εA₃₈). При использовании препаратов полинуклеотидов с более высокими и более низкими степенями модификации изменения в спектрах испускания флуоресценции смесей были аналогичны, но менее наглядны. Это обусловлено уменьшением содержания ком-

плекса в смеси при увеличении степени модификации $\text{poly}(A, \epsilon A)$ или уменьшением вклада этеноадениновой полосы флуоресценции в спектр смеси при низкой степени модификации.

На рис. 4 представлены спектры возбуждения флуоресценции свободной формы $\text{poly}(A_{62}, \epsilon A_{38})$ и смесей белка с $\text{poly}(A)$ и $\text{poly}(A_{62}, \epsilon A_{38})$. Видно, что максимум спектра возбуждения смеси $\text{poly}(A, \epsilon A)$ с белком занимает промежуточное положение между максимумами спектров $\text{poly}(A, \epsilon A)$ и смеси белка с $\text{poly}(A)$, причем этот сдвиг не носит аддитивного характера и не может быть объяснен за счет вклада триптофановой флуоресценции белка. Длинноволновое смещение спектра возбуждения этеноадениновой флуоресценции в комплексе указывает на участие в светосборе триптофановых остатков. Поскольку полоса флуоресценции триптофановых остатков белка вируса в области 280–350 нм перекрывается с длинноволновой полосой поглощения этеноадениновых остатков, можно полагать, что наблюдаемое тушение триптофановой полосы и разгорание этеноадениновой полосы флуоресценции в смеси белка вируса с $\text{poly}(A, \epsilon A)$ обусловлены безызлучательной миграцией энергии возбуждения с триптофановых остатков на этеноадениновые остатки в составе РНП.

Величина тушения триптофановой флуоресценции РНП за счет миграции энергии электронного возбуждения на этеноадениновые остатки может быть оценена из данных измерений тушения флуоресценции смесей белка с $\text{poly}(A)$ и $\text{poly}(A, \epsilon A)$ по уравнению (принимая, что оптическое поглощение смесей при 285 нм менее 0,05 оптической единицы и концентрации белка и полинуклеотида в смесях равны):

$$\frac{I_{\text{Трп}}^{\text{poly}(A, \epsilon A)}}{I_{\text{Трп}}^{\text{poly}(A)}} = \frac{\varphi_{\text{Трп}} \epsilon_{\text{Трп}}^{\text{белок}} (1-K) + \varphi_{\text{Трп}} \epsilon_{\text{Трп}}^{\text{РНП}} tKd}{\varphi_{\text{Трп}} \epsilon_{\text{Трп}}^{\text{белок}} (1-K') + \varphi_{\text{Трп}} \epsilon_{\text{Трп}}^{\text{РНП}} tK'} = \frac{(1-K) + tKd}{(1-K') + tK'}, \quad (1)$$

где $\varphi_{\text{Трп}}$ — квантовый выход флуоресценции белка ВТМ; $\epsilon_{\text{Трп}}^{\text{белок}} = \epsilon_{\text{Трп}}^{\text{РНП}} = 4,85 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$ — коэффициенты молярной экстинкции остатка триптофана в составе свободного белка ВТМ и в РНП; K и K' — степени комплексообразования по данным КД в смеси на основе $\text{poly}(A, \epsilon A)$ и $\text{poly}(A)$ соответственно; t — коэффициент, характеризующий уменьшение квантового выхода триптофана по сравнению с квантовым выходом для свободного белка; d — коэффициент, характеризующий уменьшение квантового выхода остатка триптофана в РНП, содержащем $\text{poly}(A, \epsilon A)$, за счет миграции энергии возбуждения на этеноадениновые остатки.

Коэффициент d , рассчитанный по уравнению (1) и данным измерений для смесей белка с $\text{poly}(A)$ и сополимерами $\text{poly}(A, \epsilon A)$ разной степени модификации (см. таблицу), оказался равным примерно 0,45. Таким образом, тушение триптофановой флуоресценции РНП за счет безызлучательной миграции энергии электронного возбуждения на этеноадениновые остатки $\text{poly}(A, \epsilon A)$ достигает 0,55.

В свою очередь изучение этеноадениновой флуоресценции смесей белка с $\text{poly}(A, \epsilon A)$ дает возможность определить некоторые детали структуры полинуклеотида в комплексах, а также эффективность переноса энергии с триптофановых на этеноадениновые остатки.

Увеличение интенсивности этеноадениновой флуоресценции $\text{poly}(A, \epsilon A)$ в присутствии белка в сравнении со свободной формой полинуклеотида описывается уравнением ($\lambda_{\text{возб}} \approx 325 \text{ нм}$):

$$\frac{I_{\epsilon A}^{\text{смесь}}}{I_{\epsilon A}} = \frac{\varphi_{\epsilon A} A_{\epsilon A} (1-K) + \varphi_{\epsilon A} D_{\epsilon A}^{\text{РНП}} K}{\varphi_{\epsilon A} D_{\epsilon A}} = \frac{\varphi_{\epsilon A} (1-K) + \varphi_{\epsilon A}^{\text{РНП}} K}{\varphi_{\epsilon A}}, \quad (2)$$

где $\varphi_{\epsilon A}$ и $\varphi_{\epsilon A}^{\text{РНП}}$ — квантовые выходы флуоресценции $\text{poly}(A, \epsilon A)$ в свободной форме и в составе РНП; $D_{\epsilon A}$ — оптическое поглощение $\text{poly}(A, \epsilon A)$. На

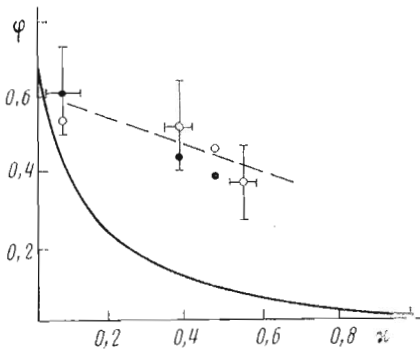


Рис. 5. Зависимость относительного квантового выхода флуоресценции этеноадениновых остатков poly(A, εA) в составе РНП от степени модификации (x). Непрерывной кривой показана зависимость выхода флуоресценции этеноадениновых остатков от степени модификации poly(A, εA) в растворе. Квантовый выход εAMP в 0,1 М фосфатном буфере (рН 6,6) при 20° принят равным 1,0

рис. 5 приведены рассчитанные по уравнению (2) значения квантового выхода флуоресценции остатка этеноаденина в составе РНП для препаратов poly(A, εA) разной степени модификации. Видно, что комплексообразование приводит к значительному выравниванию квантовых выходов флуоресценции этеноадениновых остатков сополимеров.

Ранее было установлено [1], что тушение флуоресценции poly(A, εA) в растворе обусловлено межплоскостными взаимодействиями соседних этеноадениновых оснований сополимера. Наблюдаемый эффект значительного выравнивания квантового выхода флуоресценции сополимеров poly(A, εA) в РНП можно объяснить утратой таких взаимодействий.

Эффективность переноса энергии с триптофановых на этеноадениновые остатки определялась по относительному увеличению интенсивности этеноадениновой флуоресценции (S) в присутствии белка и возбуждении при 320 и 285 нм по уравнению

$$S = \frac{I_{285}^{410} / I_{285}^{410}}{I_{320}^{410, \text{смесь}} / I_{320}^{410}} = \frac{\{\varphi_{A, \epsilon A} (1-K) \epsilon_{\epsilon A}^{285} l^{285} + \varphi_{A, \epsilon A} a K [\epsilon_{\epsilon A}^{285} (1+h^{285}) + \epsilon_{\text{Трп}} f]\} \varphi_{A, \epsilon A} \epsilon_{\epsilon A}^{320}}{\{\varphi_{A, \epsilon A} (1-K) \epsilon_{\epsilon A}^{320} + \varphi_{A, \epsilon A} a K \epsilon_{\epsilon A}^{320} (1+h^{320})\} \varphi_{A, \epsilon A} \epsilon_{\epsilon A}^{285} l^{285}}, \quad (3)$$

где $I_{285}^{410, \text{смесь}}$ — интенсивность флуоресценции смеси poly(A, εA) с белком при возбуждении в 285 нм и наблюдении при 410 нм; другие интенсивности, фигурирующие в уравнении (3), обозначены аналогично; h^λ — коэффициент гипохромизма poly(A, εA) для длины волны λ ; a — коэффициент увеличения квантового выхода этеноадениновой флуоресценции в РНП по сравнению со свободной формой (см. рис. 5); l^{285} — коэффициент увеличения выхода флуоресценции этеноаденина за счет переноса энергии возбуждения с соседних адениновых остатков в цепи poly(A, εA) [1]; f — коэффициент разгорания флуоресценции этеноадениновых остатков за счет безызлучательного переноса энергии возбуждения с триптофановых остатков.

Теоретически величина коэффициента f в уравнении (3) может изменяться в пределах от 0 до 3, поскольку белок вируса содержит три триптофановых остатка. Первый крайний случай реализуется, если все триптофановые остатки белка и этеноадениновые остатки poly(A, εA) в РНП находятся на расстоянии, исключающем безызлучательную передачу энергии возбуждения между ними, т. е. на расстоянии, значительно превышающем Ферстеровский радиус миграции энергии (R_0). Второй случай соответствует расположению всех трех триптофановых остатков белка вируса вблизи этеноадениновых остатков poly(A, εA) в РНП на расстоянии, значительно меньшем R_0 .

В таблице приведены значения коэффициента разгорания этеноадениновой флуоресценции РНП за счет передачи энергии возбуждения с триптофановых остатков белка, вычисленные по уравнению (3), для смесей белка с $\text{poly}(A, \epsilon A)$ разной степени модификации. Видно, что величина коэффициента f равна примерно 0,75. Поскольку полученное значение f меньше 1,0, то, учитывая сильную зависимость эффективности безызлучательной миграции энергии от расстояния R между донором и акцептором ($\approx R^6$) и разнесенность триптофановых остатков в первичной структуре белка вируса табачной мозаики (в положениях 17, 52 и 152), можно предположить наличие миграции энергии возбуждения лишь с одного из трех триптофановых остатков белка на этеноадениновые остатки $\text{poly}(A, \epsilon A)$ в РНП с эффективностью E , равной 0,75.

Выше была определена величина тушения триптофановой флуоресценции РНП в результате миграции энергии возбуждения на этеноадениновые остатки, равная 0,55. Однако, чтобы использовать эту величину для оценки расстояния между триптофановыми и этеноадениновыми остатками в РНП, необходимо привлечь ряд дополнительных данных о триптофановых остатках белка вируса.

Известно, что три триптофановых остатка молекулы белка вируса принадлежат к двум различным спектральным формам: I и III по классификации Веденкиной — Бурштейна [5]. Для большинства белков показано, что триптофановые остатки, причисляемые к спектральной форме I, имеют максимум испускания флуоресценции при 330–332 нм, квантовый выход $\varphi \approx 0,07–0,11$ и располагаются внутри белковой глобулы в гидрофобном окружении, а остатки, причисляемые к спектральной форме III, имеют $\lambda_{\text{макс}} \approx 350–353$ нм, $\varphi \approx 0,17–0,25$ и располагаются на поверхности белковой глобулы в свободном контакте с растворителем. Характерный низкий квантовый выход флуоресценции триптофановых остатков формы I объясняется высокой вероятностью контакта с соседними группами, способными тушить флуоресценцию ($-\text{NH}_3^+$, $-\text{COOH}$, $-\text{CONH}$ и др.). Если эти тушащие группы в непосредственном окружении триптофанового остатка отсутствуют (что встречается редко), то его квантовый выход стремится к величине, характерной для триптофана в вязких растворах с низкой диэлектрической постоянной ($\varphi \approx 0,5$). По-видимому, этот случай реализуется в белке вируса табачной мозаики: несмотря на то, что вклад спектральной формы I в общую флуоресценцию белка высок ($\lambda_{\text{макс}} \approx 320$ нм), квантовый выход флуоресценции значительно превосходит 0,07–0,11 и достигает 0,23 [6].

На основе этих данных можно составить наиболее вероятную картину размещения триптофановых остатков молекулы белка вируса табачной мозаики и приписать им определенные значения квантовых выходов флуоресценции. Триптофановая флуоресценция белка вируса представляется двумя спектральными формами, откуда следует, что по крайней мере один триптофановый остаток расположен внутри белковой глобулы, а один — на ее поверхности. Неопределенной остается локализация последнего из трех триптофановых остатков. Однако результаты исследований пертурбации спектра поглощения белка вируса в 20% этиленгликоле указывают на экспонированность в раствор лишь одного триптофанового остатка [7]. При реполимеризации молекул белка наблюдали тушение флуоресценции на 25% [4], сопровождаемое значительным уменьшением вклада спектральной формы III в суммарное свечение белка, которое представляет собой тушение поверхностного остатка триптофана в результате контактирования соседних белковых молекул. Наблюдаемая величина тушения хорошо согласуется с расчетом, если принять квантовый выход флуоресценции белка равным 0,23, квантовому выходу внешнего триптофанового остатка приписать значение 0,17–0,25 и предположить почти полное тушение его флуоресценции при образовании реполимеризованной формы или РНП. Два других остатка триптофана белка вируса локализо-

ваны внутри белковой глобулы. По крайней мере один из внутренних остатков имеет очень высокий выход флуоресценции по сравнению с обычными значениями 0,07—0,11, чем и объясняется коротковолновое положение максимума спектра испускания флуоресценции белка ВТМ и одновременно высокий квантовый выход. С высокой вероятностью можно приписать одному из внутренних триптофановых остатков обычный квантовый выход $\sim 0,07-0,11$, а другому — высокий квантовый выход $\sim 0,35-0,45$.

В рамках предлагаемой модели триптофановой флуоресценции белка вируса табачной мозаики наиболее простое объяснение вычисленного значения тушения флуоресценции в РНП с $\text{poly}(A, \epsilon A)$ по уравнению (1) (см. таблицу) можно дать, предполагая безызлучательный перенос энергии возбуждения от сильнофлуоресцирующего внутреннего триптофанового остатка на этеноадениновый остаток $\text{poly}(A, \epsilon A)$. Тогда флуоресценция этого остатка будет потушена на 65—75%, если исходить из тушения суммарной флуоресценции белка на 55%. В принципе не могут быть исключены модели, в которых миграция энергии на этеноадениновые остатки идет с двух или сразу всех трех триптофановых остатков белка вируса в РНП, однако они менее вероятны.

Расстояние между донором и акцептором энергии (R) может быть определено, если известны эффективность безызлучательного переноса энергии (E) и Ферстеровский радиус миграции энергии (R_0), по уравнению

$$E = \frac{R_0^6}{R_0^6 + R^6} \quad (4)$$

Значение R_0 в свою очередь может быть рассчитано по формуле

$$R_0^6 = \frac{9000 \ln 10 \chi^2 \varphi}{128 \pi^5 n^4 N} \int \frac{I(\nu) \epsilon(\nu)}{\nu^4} d\nu, \quad (5)$$

где χ^2 — коэффициент, учитывающий взаимную ориентацию моментов электронных переходов в доноре и акцепторе; φ — квантовый выход флуоресценции донора; n — показатель преломления среды; N — число Авогадро; $I(\nu)$ — нормированный скорректированный спектр испускания флуоресценции донора, $\int I(\nu) d\nu = 1$; $\epsilon(\nu)$ — спектр поглощения акцептора; ν — волновое число.

При расчете R_0 для пары триптофановый остаток белка вируса — этеноадениновый остаток $\text{poly}(A, \epsilon A)$ использовали скорректированный спектр испускания флуоресценции белка вируса табачной мозаики из работы [4] и спектр поглощения $\text{poly}(\epsilon A)$ ($\epsilon_{\text{poly}}^{257}(\epsilon A) = 3,55 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) [1]. Величина интеграла перекрытия при этом оказывается равной $7,9 \cdot 10^{-16}$, а $R_0 = 18,8 \text{ \AA}$ (для $\chi^2 = 2/3$, $n = 1,33$ и $\varphi = 1,0$).

Принимая полученные величины для E и R_0 , мы оценили расстояние от одного из трех триптофановых остатков белковой молекулы до оснований полинуклеотида в составе РНП по уравнению (4) как равное примерно $17 \pm 2 \text{ \AA}$. Если приврать во внимание периферическое относительно оси вируса расположение N- и C-концов полипептидной цепи белка вируса и соответственно остатков триптофана-17 и -152 [8, 9], то сближенным с областью связывания полинуклеотида следует считать остаток триптофана-52. Этот вывод, а также представление об отсутствии межплоскостного взаимодействия оснований полинуклеотида в составе вируса согласуются с последними данными рентгеноструктурного анализа в структуре РНК и РНК-связывающего центра в вирусе табачной мозаики, выполненными при разрешении 4 \AA [9].

Экспериментальная часть

Препараты poly(A, εA) получали модификацией poly(A) хлорацетальдегидом [1]. Коэффициенты молярной экстинкции и степени модификации сополимеров рассчитывали по уравнениям, выведенным нами ранее [1]. Белок вируса табачной мозаики получали ацетатным методом Френкель-Конрата [10]. Исследуя взаимодействие белка с полинуклеотидами, компоненты смешивали в мольном соотношении 1 : 3 (в пересчете на концентрацию мономера в полинуклеотидах). Смесь инкубировали в 0,1 М фосфатном буфере (pH 6,6) в течение 12–18 ч при 24°. В контрольных пробах инкубировали компоненты, взятые по отдельности. О появлении комплекса в реакционной смеси судили по разности между спектрами КД смеси и алгебраической суммой спектров ее составляющих. РНП реконструировали из белка и poly(A₉₃, εA₇), взятых в весовом соотношении 20 : 1, инкубацией в 0,1 М фосфатном буфере (pH 6,6) при 24° в течение 18–24 ч. Смесь диализовали при 4° против 0,1 М NaCl, 0,02 М трис-НСI-буфера (pH 7,0) в течение 2 сут. РНП осаждали центрифугированием на холоду при 45 000 об/мин в течение 2 ч и очищали двукратным пересаживанием из того же буфера. Концентрацию полинуклеотида в РНП определяли по содержанию общего фосфора, белок определяли методом Лоури.

Измерения спектров поглощения, КД и флуоресценции проводили аналогично работе [1]. Перед измерениями РНП и отдельные компоненты выдерживали в соответствующих буферных растворах в течение 12–16 ч.

Серия вычислений радиуса Ферстера (критическое расстояние переноса энергии возбуждения) для пары триптофановый остаток — этеноадепидиновый остаток была любезно выполнена В. С. Козловским на ЭЦВМ «Наири».

Авторы приносят благодарность канд. хим. н. Кафтановой А. С. (Институт кристаллографии АН СССР) и Козловскому В. С. (МГУ) за помощь в работе.

Дополнение. Недавно опубликованы данные по квантовым выходам флуоресценции триптофановых остатков белка ВТМ (Magne A., Gerard D., Hirth L., Laustriat G. (1977) Biochim. et biophys. acta, 495, 189–194). Эти величины ($\phi_{\text{Trp}^{17}}=0,29$; $\phi_{\text{Trp}^{52}}=0,37$; $\phi_{\text{Trp}^{152}}=0,035$) соответствуют описанной нами модели триптофановой флуоресценции белка ВТМ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Разживин А. П., Леднева Р. К., Терганова Г. В., Борисов А. Ю., Богданов А. А., Кост А. А. (1979) Биоорганической химии, 5, 691–700.
2. Lanina T. P., Ledneva R. K., Bogdanov A. A. (1974) FEBS Lett., 39, 235–238.
3. Lanina T. P., Terganova G. V., Ledneva R. K., Bogdanov A. A. (1976) FEBS Lett., 67, 167–170.
4. Guttenplan J. B., Calvin M. (1973) Biochim. et biophys. acta, 322, 294–300.
5. Бурштейн Э. А. (1973) в сб.: Молекулярная биология, т. 3, с. 127–215, ВИНТИ, М.
6. Guttenplan J. B., Calvin M. (1973) Biochim. et biophys. acta, 322, 301–320.
7. Fairhead S. M., Steel J. S., Wreford Z. J., Walker I. O. (1969) Biochim. et biophys. acta, 194, 584–593.
8. Champness J. N., Bloomer A. C., Bricogne G., Buttler P. J. G., Klug A. (1976) Nature, 254, 192–196.
9. Stubbs G., Warren S., Holmes K. (1977) Nature, 267, 216–221.
10. Fraenkel-Conrat H. (1957) Virology, 4, 1–4.

Поступила в редакцию
27.VII.1978

После доработки
9.XI.1978

INTERACTION OF TOBACCO MOSAIC VIRUS PROTEIN WITH SYNTHETIC
POLYNUCLEOTIDES CONTAINING A FLUORESCENCE LABEL. II. ENERGY
TRANSFER FROM THE TRYPTOPHAN TO ETHENOADENINE RESIDUES
OF POLY(A, ϵ A) IN RIBONUCLEOPROTEIN

LEDNEVA R. K., RAZJIVIN A. P., BOGDANOV A. A., KOST A. A.,
ZLATKIN I. V.

*A. N. Belozersky Laboratory of Molecular Biology and Bioorganic
Chemistry, M. V. Lomonosov State University, Moscow;
M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy
of Sciences of the USSR, Moscow*

The tobacco mosaic virus protein interaction with copolymers of adenylic and 1,N⁶-ethenoadenylic acids (moderate or low percentage of the latter acid) gave rise to virus-like ribonucleoproteins. Analysis of the fluorescence emission and excitation spectra revealed the energy transfer from tryptophan to 1,N⁶-ethenoadenine residues in the ribonucleoproteins. Quenching of the tryptophan fluorescence and enhancement of the ethenoadenine fluorescence allowed the distance between one of the tryptophan residues of tobacco mosaic virus protein and the ethenoadenine residues of the polynucleotide in ribonucleoprotein to be estimated as 17 ± 2 Å.
