



УДК 547.962.04:543.426

**ОЦЕНКА КОНСТАНТ СВЯЗЫВАНИЯ ИОНОВ  $\text{Ca}^{2+}$  БЕЛКАМИ  
ПО ИЗМЕНЕНИЯМ ИХ СОБСТВЕННОЙ ТИРОЗИНОВОЙ  
И ФЕНИЛАЛАНИНОВОЙ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ***Пермяков Е. А., Ярмоленко В. В., Калининченко Л. П.,  
Бурштейн Э. А.**Институт биологической физики Академии наук СССР,  
Московская область, г. Пущино*

Фенилаланиновая и тирозиновая флуоресценция  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающих белков (компоненты рI 3,95; 4,25 и 4,47 парвальбумина карпа; тропонин-С из скелетных мышц кролика; калмодулин из мозга крупного рогатого скота) была использована для оценки констант связывания  $\text{Ca}^{2+}$  этими белками. Связывание  $\text{Ca}^{2+}$  повышает квантовый выход флуоресценции белков. На основе схем кооперативного и некооперативного связывания рассчитаны теоретические кривые флуориметрического титрования  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающих белков кальцием и EGTA, а также pH-зависимости их флуоресценции в присутствии  $\text{Ca}^{2+}$  и EGTA. Теоретические кривые подгоняли к экспериментальным точкам, варьируя величины констант ассоциации кальция. Константы связывания  $\text{Ca}^{2+}$ , рассчитанные на основе схем кооперативного и некооперативного связывания, оказались практически одинаковыми.

Ионы кальция играют ключевую роль во многих физиологических процессах. По этой причине исследование  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающих свойств различных клеточных компонентов, в том числе и белков, является весьма актуальной задачей. Обычные методы измерения констант связывания  $\text{Ca}^{2+}$  белками, как, например, равновесный и проточный диализ, довольно трудоемки и неточны. Кроме того, измерение высоких величин констант связывания требует применения  $\text{Ca}^{2+}$  — EGTA или  $\text{Ca}^{2+}$  — EDTA-буферных растворов довольно большой концентрации. Однако есть данные, говорящие о возможности прямого взаимодействия кальциевых хелаторов EGTA и EDTA с белком [1, 2], что может привести к существенным ошибкам в измерении констант связывания  $\text{Ca}^{2+}$ .

Нами был предложен метод оценки констант связывания  $\text{Ca}^{2+}$  белками по изменениям его собственной триптофановой флуоресценции [3, 4]. Метод, разработанный на примере парвальбумина мерланга, включает в себя последовательное проведение трех типов экспериментов: 1) титрование ионами кальция белка, предварительно освобожденного от  $\text{Ca}^{2+}$ , 2) титрование белка, насыщенного  $\text{Ca}^{2+}$ , кальциевым хелатором EGTA, 3) pH-титрование белка в присутствии  $\text{Ca}^{2+}$  и EGTA. Высокая информативность триптофановой флуоресценции белка позволяет выделить вклады излучения различных состояний белка в общий спектр флуоресценции. Далее, задаваясь конкретной равновесной схемой связывания ионов  $\text{Ca}^{2+}$  молеку-

---

EGTA — этиленгликоль-бис(β-аминоэтиловый эфир)-N,N,N',N'-тетраацетат.

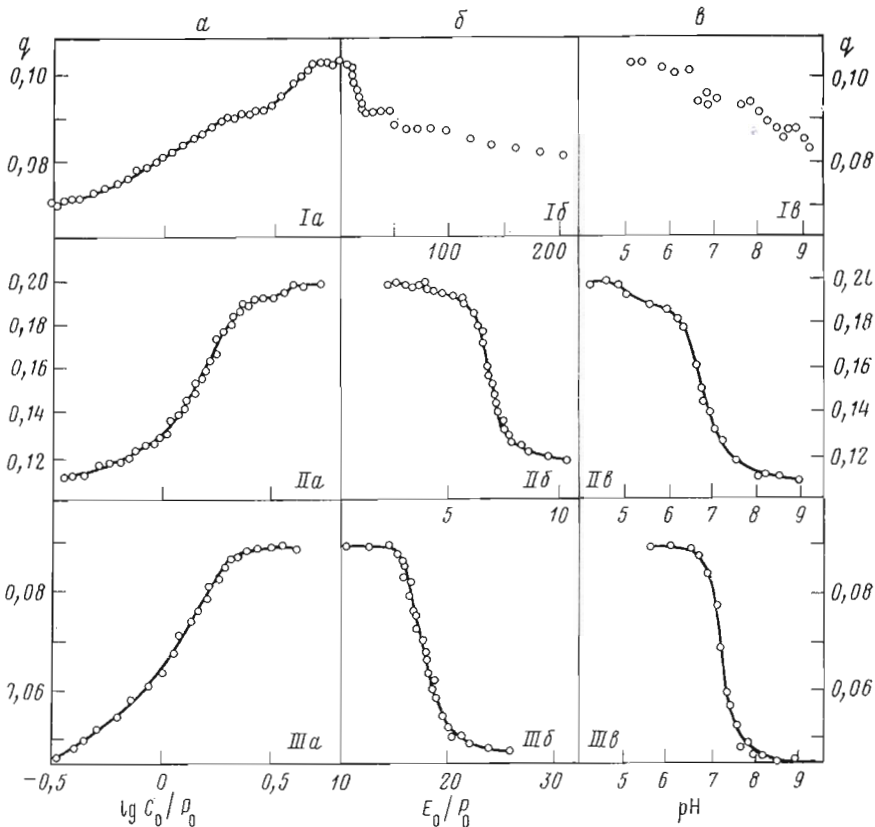


Рис. 1. Титрование образцов парвальбуминов карпа рI 4,25 (I), 4,47 (II), 3,95 (III) ионами  $\text{Ca}^{2+}$  (а) и EGTA (б) при pH 8,1, а также pH-титрование этих образцов (в). Концентрация ( $10^{-5}$  M) компонентов в системах: (Iа)  $P_0$  7, (IIа)  $P_0$  10,5, (IIIа)  $P_0$  8,1; (Iб)  $P_0$  6,6,  $C_0$  40,5, (IIб)  $P_0$  10,5,  $C_0$  87,3, (IIIб)  $P_0$  4,1,  $C_0$  63,9; (Iв)  $P_0$  5,8,  $C_0$  35,6, [EGTA] 132,1, (IIв)  $P_0$  9,5,  $C_0$  80,0, [EGTA] 177,0, (IIIв)  $P_0$  3,8,  $C_0$  53,1, [EGTA] 171,5.  $P_0$  и  $C_0$  — общие концентрации белка и  $\text{Ca}^{2+}$  соответственно; точки — экспериментальные данные, кривые — теоретические, рассчитанные по схеме и подогнанные к экспериментальным точкам

лой белка, можно оценить константы связывания  $\text{Ca}^{2+}$  различными центрами. Хотя все три типа измерений использовались по отдельности и раньше, их проведение на одном и том же препарате позволяет более однозначно и корректно определять константы связывания  $\text{Ca}^{2+}$  в широком диапазоне их величин.

Необходимо отметить, что наличие остатков триптофана в аминокислотной последовательности таких  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающих белков, как парвальбумин, тропонин-С и калмодулин, — уникальное явление [5–7]. Аминокислотный состав этих белков отличается большим содержанием остатков фенилаланина, наличием (не всегда) остатков тирозина и отсутствием (почти всегда) остатков триптофана. Известно, однако, что тирозиновая и в особенности фенилаланиновая флуоресценция гораздо менее чувствительна к изменениям в окружении хромофоров по сравнению с триптофановой флуоресценцией [8, 9]. Единственным информативным параметром в случае тирозиновой и фенилаланиновой флуоресценции является квантовый выход флуоресценции. Отметим, что в случае триптофановой флуоресценции о состоянии белка можно судить по положению и полуширине спектра, по величине квантового выхода флуоресценции, а также по форме спектра [9]. Цель настоящего сообщения — показать, что, несмотря на ограниченность информации, получаемой из фенилаланиновой и тирозино-

вой флуоресценции, излучение остатков тирозина и фенилаланина в белках можно использовать для оценки констант связывания  $\text{Ca}^{2+}$  белками.

Из рис. 1 (Ia и IIa) видно, что постепенное увеличение концентрации кальция вызывает рост квантового выхода флуоресценции, парвальбуминов  $rI$  4,25 и 4,47 карпа, который определяется, по-видимому, конформационными изменениями в молекуле белка, индуцированными связыванием  $\text{Ca}^{2+}$  [10]. Кривые имеют разные наклоны при  $C_0/P_0 < 1$  и при  $1 < C_0/P_0 < 2$ , что, вероятно, соответствует последовательному заполнению хорошо известных CD- и EF-центров в молекуле парвальбумина [11]. В области относительных концентраций  $\text{Ca}^{2+} + C_0/P_0 > 2$  можно видеть другое ступенчатое увеличение квантового выхода флуоресценции, которое невозможно объяснить, предполагая, что ионы  $\text{Ca}^{2+}$  не взаимодействуют ни с какими другими центрами связывания в парвальбумине, кроме CD- и EF-центров. Таким образом, в данном случае собственная фенилаланиновая флуоресценция белка позволяет зарегистрировать дополнительные центры связывания  $\text{Ca}^{2+}$  в парвальбуминах  $rI$  4,25 и 4,47 карпа, отличные от CD- и EF-центров. Наличие таких центров в парвальбумине следует и из данных других методов [12, 13].

Отметим, что 10 остатков фенилаланина в парвальбуминах  $rI$  4,25 и 4,47 карпа расположены на довольно близких расстояниях друг от друга (не далее 0,75 нм, согласно данным рентгеноструктурного анализа [11, 14]). Расстояние резонансного переноса энергии возбуждения с эффективностью 50% для донорно-акцепторной пары Phe — Phe в водном растворе составляет 0,55–0,64 нм, а в белках может быть примерно в 1,1–1,4 раза больше [8]. По этой причине 10 остатков фенилаланина в парвальбуминах являются единой системой с почти 100% эффективностью переноса энергии возбуждения между ними. В этом случае более или менее серьезное изменение структуры практически в любой части белковой глобулы может привести к изменениям фенилаланиновой флуоресценции белка. Флуоресценция единичных остатков триптофана и тирозина в  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающих белках чувствительна к изменениям лишь в непосредственном ближайшем окружении этих хромофоров [8, 9].

Квантовый выход тирозиновой флуоресценции парвальбумина  $rI$  3,95, скелетного тропонина-С кролика и калмодулина из мозга крупного рогатого скота возрастает, как и в случае фенилаланиновой флуоресценции, при увеличении концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  в растворе (рис. 1 и 2). Из рис. 1 (IIIa) видно, что флуоресценция единственного тирозинового остатка парвальбумина  $rI$  3,95 карпа чувствительна к связыванию  $\text{Ca}^{2+}$  лишь CD- и EF-центрами. В случае тропонина-С (рис. 2, Ia) на графике можно выделить по меньшей мере три различных участка:  $C_0/P_0 < 1$ ;  $1 < C_0/P_0 < 2$ ;  $2 < C_0/P_0 < 4-5$ . По-видимому, эти участки отвечают последовательному заполнению ионами  $\text{Ca}^{2+}$  различных центров связывания тропонина-С, который, как хорошо известно, имеет четыре центра связывания  $\text{Ca}^{2+}$  [15]. Подобные участки на графике зависимости квантового выхода флуоресценции от относительной концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  можно выделить и для калмодулина, обладающего также четырьмя центрами связывания  $\text{Ca}^{2+}$  [16]. Для этой кривой характерны очень малый флуоресцентный ответ на посадку первого  $\text{Ca}^{2+}$  и сравнимые ответы на посадку второго и третьего ионов  $\text{Ca}^{2+}$ .

Результаты титрования насыщенных  $\text{Ca}^{2+}$  белков кальциевым хелатом EGTA (рис. 1, Ib, IIb, IIIb, рис. 2, Ib, IIb) показывают, что квантовый выход флуоресценции исследованных белков уменьшается с ростом относительной концентрации EGTA в растворе,  $E_0/P_0$  ( $E_0$  — общая концентрация EGTA).

Степень насыщения белка ионами  $\text{Ca}^{2+}$  можно также варьировать, меняя pH системы, содержащей белок,  $\text{Ca}^{2+}$  и EGTA.  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающие свойства исследуемых белков не меняются в диапазоне pH от 5 до 9 [3, 4, 17], в то время как константа ассоциации  $\text{Ca}^{2+}$  — EGTA изменяется в этом диапазоне от  $10^4$  до  $10^{10}$   $\text{M}^{-1}$  [18]. Таким образом, pH-титрование

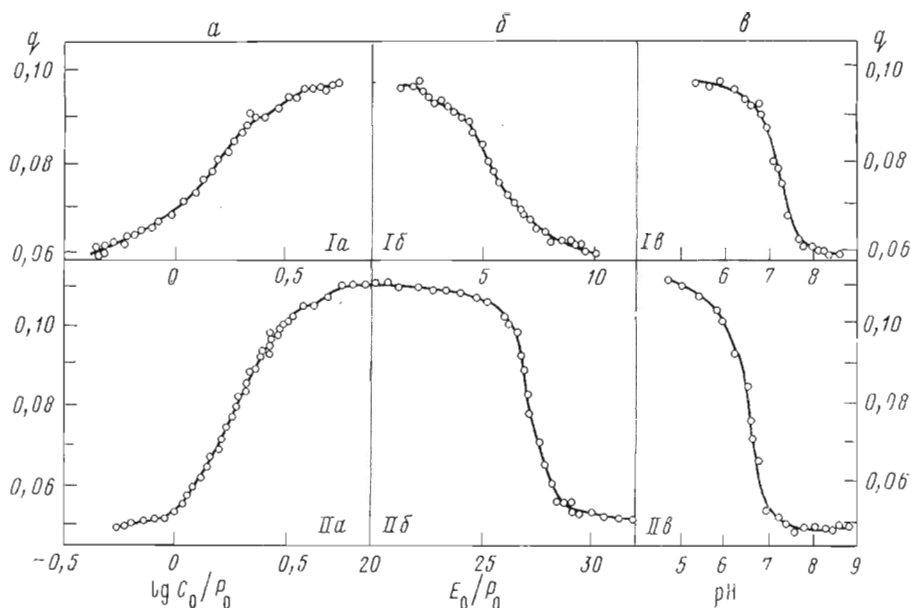
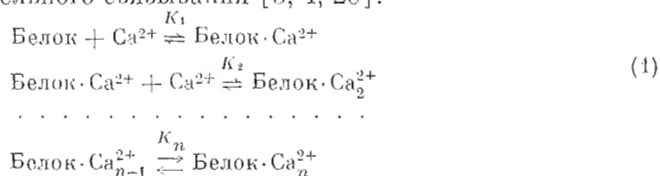


Рис. 2. Титрование тропонина-С (I) и калмодулина (II) ионами  $\text{Ca}^{2+}$  (а), EGTA (б) и pH-титрование этих образцов (в). Концентрация ( $10^{-5}$  M) компонентов в системах: (Iа)  $P_0$  7,9, pH 7,8, (IIа)  $P_0$  4,1, pH 8,1; (Iб)  $P_0$  7,8,  $C_0$  40,2, pH 7,8, (IIб)  $P_0$  4,0,  $C_0$  119,0, pH 8,2; (Iв)  $P_0$  7,7,  $C_0$  36,0, [EGTA] 98,3, (IIв)  $P_0$  3,6,  $C_0$  105,0, [EGTA] 120,0. Пояснения см. в подписи к рис. 1

системы, содержащей  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающий белок,  $\text{Ca}^{2+}$  и EGTA, вызывает существенное перераспределение  $\text{Ca}^{2+}$  между белком и EGTA (рис. 1, Iв, IIв, IIIв и рис. 2, Iв, IIв).

Из рис. 1, 2 видно, что почти все особенности кривых титрования белков ионами  $\text{Ca}^{2+}$  наблюдаются при титровании насыщенных кальцием белков EGTA и в pH-зависимостях выхода флуоресценции белков в присутствии  $\text{Ca}^{2+}$  и EGTA. Исключение составляет парвальбумин рI 4,25 карпа, для которого добавление даже очень высоких концентраций EGTA не снижает величину квантового выхода флуоресценции до значения, характерного для бескальциевой формы белка. Можно предположить наличие прямого взаимодействия EGTA с этим белком, что приводит к изменениям его структуры и необратимости эффектов связывания  $\text{Ca}^{2+}$  при добавлении EGTA. Возможность такого взаимодействия была отмечена некоторыми авторами [1, 2].

Для оценки констант связывания  $\text{Ca}^{2+}$  белками необходимо задаться конкретной схемой связывания. Отметим, что флуоресцентные данные не позволяют однозначно выбрать схему связывания. Многие авторы на основании различных данных предполагают кооперативный механизм связывания  $\text{Ca}^{2+}$  парвальбумином, тропонином-С и калмодулином [3, 4, 19–22]. Минимальная схема кооперативного связывания  $\text{Ca}^{2+}$  белком представляет собой схему последовательного связывания [3, 4, 20]:



$K_1, K_2, \dots, K_n$  — равновесные константы связывания, соответствующие связыванию  $\text{Ca}^{2+}$  первым, вторым и т. д. центрами. В присутствии EGTA к этой схеме добавляется еще уравнение для связывания  $\text{Ca}^{2+}$  EGTA. На

Величины констант связывания  $\text{Ca}^{2+}$  парвальбумином карпа, тропонином-С из скелетных мышц кролика и калмодулином из мозга крупного рогатого скота, полученные из подгонки теоретических кривых, рассчитанных согласно схеме, к экспериментальным данным

Условия экспериментов указаны на рис. 1 и 2. Подчеркнуты наиболее корректно определенные величины констант связывания

Тип эксперимента	$\lg K_1$	$\lg K_2$	$\lg K_3$	$\lg K_4$
Парвальбумин $pI$ 4,25 карпа				
Титрование $\text{Ca}^{2+}$	8,8	7,3	<u>6,1</u>	<u>5,4</u>
Парвальбумин $pI$ 4,47 карпа				
Титрование $\text{Ca}^{2+}$	8,5	7,4	6,0	<u>4,8</u>
Титрование EGTA	<u>8,7</u>	<u>6,6</u>	5,5	<u>4,3</u>
pH-титрование	<u>8,3</u>	<u>6,8</u>	5,7	5,5
Парвальбумин $pI$ 3,95 карпа				
Титрование $\text{Ca}^{2+}$	7,5	5,9	—	—
Титрование EGTA	<u>7,2</u>	<u>7,1</u>	—	—
pH-титрование	<u>7,7</u>	<u>7,1</u>	—	—
Тропонин-С				
Титрование $\text{Ca}^{2+}$	8,7	7,4	<u>5,2</u>	<u>4,5</u>
Титрование EGTA	<u>7,7</u>	<u>7,5</u>	<u>6,1</u>	<u>5,2</u>
pH-титрование	8,6	<u>7,5</u>	6,7	4,7
Калмодулин				
Титрование $\text{Ca}^{2+}$	9,9	7,7	<u>6,5</u>	<u>4,4</u>
Титрование EGTA	<u>8,3</u>	<u>6,6</u>	<u>5,4</u>	<u>4,6</u>
pH-титрование	6,1	<u>6,1</u>	5,7	4,2

основании схемы связывания  $\text{Ca}^{2+}$  были рассчитаны теоретические кривые  $\text{Ca}^{2+}$ , EGTA- и pH-титрования парвальбуминов, тропонина-С и калмодулина, которые подгоняли к экспериментальным точкам на ЭВМ с помощью программы оптимизации [23]. Подгонку осуществляли варьированием: а) величин констант ассоциации (в пределах от  $10^2$  до  $10^{10}$   $\text{M}^{-1}$ ); б) начальной концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  в растворе ( $\pm 10\%$ ); в) концентрации маточного раствора  $\text{Ca}^{2+}$  или EGTA, используемых для титрования ( $\pm 10\%$ ); г) квантовых выходов флуоресценции белков в состояниях, различающихся содержанием  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\pm 10\%$ ).

Начальные значения квантовых выходов флуоресценции белков в различных  $\text{Ca}^{2+}$ -состояниях брали равными экспериментальным значениям при соответствующем содержании  $\text{Ca}^{2+}$ . Величины констант ассоциации  $\text{Ca}^{2+}$ , полученные с помощью этой процедуры, приведены в таблице. Экспериментальные данные для парвальбуминов  $pI$  4,25 и 4,47, для тропонина-С и калмодулина хорошо описываются схемой последовательного связывания четырех ионов  $\text{Ca}^{2+}$  молекулой белка, в то время как данные для парвальбумина  $pI$  3,95 карпа соответствуют связыванию двух ионов  $\text{Ca}^{2+}$ . Нам не удалось подогнать экспериментальные данные для парвальбуминов карпа  $pI$  4,25 и 4,47 моделью с тремя центрами связывания: при любых значениях подгоняемых параметров теоретическая кривая плохо соответствовала экспериментальным точкам, что особенно проявлялось в зоне  $C_0/P_0 > 2$  на графиках титрования белков ионами кальция.

Высокие величины констант ассоциации  $\text{Ca}^{2+}$  более достоверно определяются из экспериментов по титрованию белков EGTA, когда они сравнимы по величине с константой ассоциации  $\text{Ca}^{2+}$  — EGTA, а низкие корректнее всего оцениваются из эксперимента по титрованию белка  $\text{Ca}^{2+}$ , когда

они сравнимы по величине с обратной концентрацией белка и  $\text{Ca}^{2+}$ . В таблице отмечены наиболее корректно с этой точки зрения оцененные величины констант связывания.

К сожалению, метод флуоресценции не позволяет однозначно установить точный механизм связывания  $\text{Ca}^{2+}$ . Оказалось, что схема некооперативного связывания  $\text{Ca}^{2+}$  белком также хорошо описывает экспериментальные данные. Рассчитанные на основе кооперативной и некооперативной схем связывания константы ассоциации  $\text{Ca}^{2+}$  — белок оказались практически одинаковыми.

Величины оцененных нами констант связывания  $\text{Ca}^{2+}$  парвальбуминами, тропонином-С и калмодулином довольно хорошо согласуются с известными из литературы данными [15, 16, 24]. В литературе существует довольно значительный разброс в величинах констант связывания  $\text{Ca}^{2+}$  парвальбуминами. Многие методы неспособны различить связывание ионов  $\text{Ca}^{2+}$  отдельными CD- и EF-центрами. Поэтому авторы, пользующиеся такими методами, считают CD- и EF-центры независимыми и эквивалентными. Величины логарифмов констант связывания  $\text{Ca}^{2+}$ , полученные этими методами для двух равноценных центров, лежат в диапазоне от 8,0 до 8,7 [25], т. е. близки к значениям, полученным в данной работе для наиболее сильных центров связывания парвальбуминов карпа. В тех работах, где метод позволяет различить два центра связывания, для них получают две различные константы связывания, величины которых довольно хорошо согласуются с величинами, полученными в настоящей работе (например, для парвальбумина мерлузы  $\lg K_1$  8,4 и  $\lg K_2$  7,2 [4]). Общеприятые значения величин логарифмов констант связывания  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\text{Ca}^{2+}$ — $\text{Mg}^{2+}$ )-центрами и  $\text{Ca}^{2+}$ -специфичными центрами скелетного тропонина С составляют 7,3 и 5,3 соответственно [15], что хорошо совпадает с величинами, приведенными в настоящей работе. Несколько хуже совпадение полученных нами данных с литературными в случае калмодулина. Обычно сообщаемая в литературе величина логарифма константы связывания  $\text{Ca}^{2+}$  калмодулином лежит в диапазоне от 6 до 7 [26], что соответствует второй и третьей константам, определенным нами. Тем не менее эти значения константы связывания  $\text{Ca}^{2+}$  калмодулином получены в большинстве случаев из положения середины кривой изменения какого-либо физического параметра белка в зависимости от концентрации свободного  $\text{Ca}^{2+}$ , т. е. являются усредненными. В отличие от этих данных предложенный метод позволяет различить связывание  $\text{Ca}^{2+}$  по каждому из четырех центров и оценить их индивидуальные константы связывания.

Серьезным ограничением применимости описанного метода могут стать прямые взаимодействия между белком и кальциевым хелатором. О наличии таких взаимодействий свидетельствует собственная флуоресценция в случае парвальбумина рI 4,25 карпа и EGTA. В литературе имеются данные, полученные другими методами (ЯМР, дифференциальная спектрофотометрия), что парвальбумин в бескальциевой форме способен взаимодействовать с EGTA [1, 2]. Однако константа связывания EGTA с белком довольно низка ( $\sim 30 \text{ M}^{-1}$  [1]). В наших экспериментах мы никогда не достигали таких концентраций EGTA, чтобы это связывание серьезно сказывалось на полученных результатах.

Таким образом, несмотря на ограниченность информации, получаемой из тирозиновой и фенилаланиновой флуоресценции белка, ее вполне можно использовать для оценки параметров связывания ионов белками.

### Экспериментальная часть

Компоненты рI 3,95; 4,25 и 4,47 парвальбумина карпа выделяли по описанной ранее методике [27]. Препарат тропонина-С был любезно предоставлен нам А. А. Корыстовой (Институт биологической физики АН СССР), а препарат калмодулина — Х. Бжеской (Институт эксперименталь-

ной биологии им. Ненского, Варшава). Чистоту и гомогенность белковых препаратов контролировали электрофоретически и спектрофотометрически.

Удаление  $\text{Ca}^{2+}$  из белковых препаратов производили по методике Блюма с соавт. [28], включающей в себя инкубацию белка в растворе EGTA и EDTA высокой концентрации и гель-фильтрацию смеси на колонке с сефадексом G-25.

Все растворы готовили на деионизованной воде, дистиллированной в кварцевом дистилляторе. В работе использовали только полиэтиленовую посуду. Общее содержание  $\text{Ca}^{2+}$  в препаратах оценивали с помощью атомно-абсорбционного спектрофотометра AAS-I (Carl Zeiss, Jena).

Растворы  $\text{CaCl}_2$  готовили из  $\text{CaCO}_3$ . EGTA (Eastman Organic), трис (Reanal) использовали без дополнительной очистки. Точность приготовления концентраций  $\text{CaCl}_2$  и EGTA была не ниже  $\pm 10\%$ .

Величину pH растворов белка измеряли с помощью pH-метра pH-340 с точностью  $\pm 0,02$  единицы pH.

Концентрацию белка измеряли спектрофотометрически, используя известные из литературы коэффициенты экстинкции, с точностью  $\pm 5\%$ .

Флуоресценцию измеряли на спектрофлуориметре, описанном ранее [29, 30]. Возбуждение флуоресценции производили светом ртутных линий при 265,2 и 280,4 нм. Свет флуоресценции собирали с передней поверхности кюветы с образцом. Величину квантового выхода флуоресценции белков оценивали, сравнивая площади под спектрами исследуемого раствора и водных растворов фенилаланина или тирозина одинаковой оптической плотности при длине волны возбуждения. Квантовые выходы флуоресценции фенилаланина и тирозина в воде при  $20^\circ\text{C}$  брали равными 0,038 и 0,20 [31].

Точность и воспроизводимость измерений интенсивности и квантового выхода флуоресценции были не хуже  $\pm 2\%$ .

Подгонку экспериментальных данных теоретическими кривыми производили на ЭВМ М-4030, используя известную программу оптимизации [23].

Величины отклонений теоретических значений от экспериментальных составляли менее 1,5%.

Точность определения  $\lg K_i$  составляла  $\pm 0,5$ . Величины констант связывания  $\text{Ca}^{2+}$  — EGTA при различных pH брали из литературы [18].

Авторы выражают благодарность А. А. Корыстовой (Институт биологической физики АН СССР, Пущино) и Х. Бжеской (Институт экспериментальной биологии им. Ненского, Варшава, ПНР) за предоставленные в наше распоряжение препараты тропонина-С и калмодулина.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Haiech J., Derancourt J., Pechere J. F., Demaille J. G. Magnesium and calcium binding to parvalbumins: evidence for differences between parvalbumins and an explanation of their relaxing function.— *Biochemistry*, 1979, v. 18, № 13, p. 2752–2758.
2. Cavè A., Pages M., Morin P. Conformational studies on muscular parvalbumins. Cooperative binding of calcium(II) to parvalbumin.— *Biochimie*, 1979, v. 61, № 6, p. 607–613.
3. Пермяков Е. А., Ярмоленко В. В., Емельяненко В. И., Бурштейн Э. А., Жердей Ш., Клоссе Ж. Изучение связывания ионов кальция парвальбумином мерланга по изменению параметров собственной флуоресценции белка.— *Биофизика*, 1980, т. 25, № 3, с. 417–422.
4. Permyakov E. A., Yarmolenko V. V., Emelyanenko V. I., Burstein E. A., Closset J., Gerday Ch. Fluorescence studies of the calcium binding to whiting (*Gadus merlangus*) parvalbumin.— *Eur. J. Biochem.*, 1980, v. 109, № 1, p. 307–315.
5. Pechère J. F. Muscular parvalbumins as homologous proteins.— *Compar. Biochem. and Physiol.*, 1968, v. 24, № 3, p. 289–295.
6. Collins J. H., Greaser M. L., Potter J. D., Horn M. J. Determination of the amino acid sequence of troponin C from rabbit skeletal muscle.— *J. Biol. Chem.*, 1977 v. 252, № 18, p. 6356–6362.



7. Watterson D. M., Sharief F., Vanaman T. C. The complete amino acid sequence of  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent modulator protein (calmodulin) of bovine brain.— *J. Biol. Chem.*, 1980, v. 255, № 3, p. 969–975.
8. Бурштейн Э. А. Люминесценция белковых хромофоров (модельные исследования).— Итоги науки и техники. Биофизика, 1976, т. 6, ВИНТИ, М.
9. Бурштейн Э. А. Собственная люминесценция белка (природа и применение).— Итоги науки и техники. Биофизика, 1977, т. 7, ВИНТИ, М.
10. Burstein E. A., Permyakov E. A., Emelyanenko V. I., Bushueva T. L., Pechère J. F. Investigation of some physico-chemical properties of muscular parvalbumins by means of luminescence of their phenylalanine residues.— *Biochim. et biophys. acta*, 1975, v. 400, № 1, p. 1–16.
11. Kretsinger R. H., Nockolds C. E. Carp muscle calcium-binding protein. II. Structure determination and general description.— *J. Biol. Chem.*, 1973, v. 248, № 9, p. 3313–3326.
12. Cave A., Daures M. F., Parello J., Saint-Ives A., Sempre R. NMR studies of primary and secondary sites of parvalbumins using the two paramagnetic probes Gd(III) and Mn(II).— *Biochimie*, 1979, v. 61, № 6, p. 755–765.
13. Miller T. L., Cook R. M., Nelson D. J., Theodorarides A. D. Terbium luminescence from the calcium binding sites of parvalbumin.— *J. Mol. Biol.*, 1980, v. 141, № 2, p. 223–226.
14. Nockolds C. E., Kretsinger R. H., Coffee C. J., Bradshaw R. A. Structure of a calcium binding carp myogen.— *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1972, v. 69, № 3, p. 581–584.
15. Potter J. D., Gergely J. The calcium and magnesium binding sites on troponin and their role in the regulation of myofibrillar adenine triphosphatase.— *J. Biol. Chem.*, 1975, v. 250, № 12, p. 4628–4633.
16. Wolff D. J., Brostrom M. A., Brostrom C. O. Divalent cation binding sites of CDR and their role in the regulation of brain cyclic nucleotide metabolism.— In: Calcium binding proteins and calcium function/Ed. R. H. Wasserman et al. N. Y., North-Holland, 1977, p. 97–106.
17. Leavis P. C., Lehrer S. S. Intrinsic fluorescence studies on troponin C.— *Arch. Biochem. and Biophys.*, 1978, v. 187, № 1, p. 243–251.
18. Schwarzenbach G., Flaschka H. Die Komplexeometrische Titration. Stuttgart: Ferdinand Enke Verlag, 1965.
19. Coffee C. J., Bradshaw R. A., Kretsinger R. H. The coordination of calcium by carp muscle calcium binding proteins A, B.— In: Advances of experimental medicine and biology. Protein-Metal Interactions/Ed. M. Friedman. N. Y.: Plenum Press, 1974, v. 48, p. 211–233.
20. Pechère J. F. The significance of parvalbumins among muscular calciproteins.— In: Calcium binding proteins and calcium function/Eds R. H. Wasserman et al. N. Y.: North-Holland, 1977, p. 213–221.
21. Reid R. E., Hodges P. S. Co-operativity and calcium/magnesium binding to troponin C and muscle calcium binding parvalbumin: an hypothesis.— *J. Theor. Biol.*, 1980, v. 84, № 3, p. 401–444.
22. Crouch T. H., Klee C. B. Positive cooperative binding of calcium to bovine brain calmodulin.— *Biochemistry*, 1980, v. 19, № 15, p. 3692–3698.
23. Reich J. G., Wangemann G., Falck M., Rohde K. A general strategy for parameter estimation from isosteric and allosteric-kinetic data and binding measurements.— *Eur. J. Biochem.*, 1972, v. 26, № 3, p. 368–379.
24. Moeschler H. J., Schaer J. J., Cox J. A. A thermodynamic analysis of the binding of calcium and magnesium ions to parvalbumin.— *Eur. J. Biochem.*, 1980, v. 111, № 1, p. 73–78.
25. Lee L., Sykes B. D. Proton nuclear magnetic resonance determination of the sequential ytterbium replacement of calcium in carp parvalbumin.— *Biochemistry*, 1981, v. 20, № 5, p. 1156–1162.
26. Klee C. B., Crouch C., Richman P. G. Calmodulin.— *Ann. Rev. Biochem.*, 1980, v. 49, p. 489–515.
27. Pechère J. F., Demaille J., Capony J. P. Muscular parvalbumins: preparative and analytical methods of general applicability.— *Biochim. et biophys. acta*, 1971, v. 236, № 3, p. 391–408.
28. Blum H. E., Lehky P., Kohler L., Stein E. A., Fisher E. H. Comparative properties of vertebrate parvalbumins.— *J. Biol. Chem.*, 1977, v. 252, № 9, p. 2834–2838.
29. Burstein E. A., Permyakov E. A., Yashin V. A., Burkchanov S. A., Finazzi-Agro A. The fine structure of luminescence spectra of azurin.— *Biochim. et biophys. acta*, 1977, v. 491, № 2, p. 155–159.
30. Permyakov E. A., Burstein E. A., Sawada Y., Yamazaki I. Luminescence of phenylalanine residues in superoxide dismutase from green pea.— *Biochim. et biophys. acta*, 1977, v. 491, № 2, p. 149–154.
31. Teale F. W. J., Weber G. Ultraviolet fluorescence of the aromatic amino acids.— *Biochem. J.*, 1957, v. 65, № 4, p. 476–482.

Получила в редакцию  
23.III.1981



EVALUATION OF THE  $\text{Ca}^{2+}$  BINDING CONSTANTS FOR PROTEINS BASING ON  
CHANGES IN THEIR INTRINSIC TYROSINE AND PHENYLALANINE FLUORESCENCE

PERMYAKOV E. A., YARMOLENKO V. V., KALINICHENKO L. P.,  
BURSTEIN E. A.

*Institute of Biological Physics, Academy of Sciences  
of the USSR, Pushchino*

Intrinsic tyrosine and phenylalanine fluorescence of the  $\text{Ca}^{2+}$ -binding proteins (components pI 3,95; 4,25 and 4,47 of carp parvalbumin, rabbit skeletal muscle troponin-C and bovine brain calmodulin) has been used for the evaluation of their  $\text{Ca}^{2+}$  binding constants. The  $\text{Ca}^{2+}$  binding causes an increase in the protein fluorescence quantum yield. Theoretical fluorimetric  $\text{Ca}^{2+}$ -, EGTA- and pH-titration curves were computed on the base of either cooperative or noncooperative binding schemes and fitted to the experimental points by varying the  $\text{Ca}^{2+}$  association constants. The  $\text{Ca}^{2+}$  binding constants obtained with cooperative and noncooperative binding schemes are practically the same.