

УДК 577.155.3, 535.372

М. Л. ГЕВОРКЯН, М. А. ДАВТЯН

## О НЕКОТОРЫХ ОСОБЕННОСТЯХ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ АРГИНАЗЫ

Спектр флуоресценции (ФЛ) растворов аргиназы при возбуждении ультрафиолетовым светом с длиной волны  $\lambda_{\text{возб}}=257\text{нм}$  по форме и положению максимума сходен со спектром ФЛ, возникающей при  $\lambda_{\text{возб}}=297\text{нм}$ . Изменение рН растворов аргиназы, взаимодействие с гидроксиламином, а также длительный диализ влияют на отношение интенсивностей ФЛ в максимуме при указанных длинах волн возбуждения ( $I_{257}^{\text{max}}/I_{297}^{\text{max}}$ ), что связано, по-видимому, с изменением микроокружения ароматических аминокислотных остатков в аргиназе при различных воздействиях на фермент. Сравнительное изучение спектров ФЛ при  $\lambda_{\text{возб}}=257$  и  $297\text{нм}$ , очевидно, может использоваться как дополнительный чувствительный метод для получения новой информации о небольших конформационных изменениях белковых молекул.

Исследование спектров флуоресценции (ФЛ) является одним из распространенных методов изучения конформационных изменений белков в растворах. Основными хромофорами в белках, флуоресцирующими при возбуждении ультрафиолетовым светом с  $\lambda_{\text{возб}}=280\text{нм}$ , являются остатки триптофана и тирозина [1, 2]. Остатки фенилаланина поглощают энергию в более коротковолновой области спектра и слабо флуоресцируют [3], чем и объясняется отсутствие внимания к ним при изучении флуоресцентных свойств белковых молекул. В настоящей работе изучалась ФЛ растворов аргиназы печени быка при возбуждении ультрафиолетовым светом с  $\lambda_{\text{возб}}=257\text{нм}$ , при которой энергию поглощают также и остатки фенилаланина.

**Материалы и методы.** В работе использовали лиофилизированный препарат аргиназы печени быка и глицин фирмы Reanal (Венгрия). Остальные реактивы – отечественного производства с маркой ч.д.а. или х.ч. Растворы белка готовили на  $0,05\text{М}$  глициновом или  $0,01\text{М}$  фосфатном буферах в концентрациях  $10^{-6}$ – $10^{-7}\text{М}$ . Спектры ФЛ измеряли на спектрофлуориметре Cary Eclipse Varian при ширине щелей монохроматоров 5 и 10 нм для возбуждения и излучения соответственно.

Обработку гидроксиламином (ГА) проводили при комнатной температуре ( $20^{\circ}\text{C}$ ). К раствору аргиназы ( $8 \cdot 10^{-6}\text{М}$ ) на фосфатном буфере (рН 6) до-

бавляли 50ММ ГА и инкубировали в течение 60 минут. Перед измерением спектров ФЛ пробу разбавляли буфером в 5 раз. Диализ проводили при 4°C и постоянном перемешивании с помощью магнитной мешалки. Раствор аргиназы на 0,01М глициновом буфере (рН 7) диализовали против 280–300 объемов дистиллированной воды в течение 18 часов. Затем пробу разбавляли в 5 раз фосфатным буфером (рН 6) или водой и снимали спектры ФЛ.

**Результаты и обсуждение.** Флуоресцентные свойства аргиназы печени быка изучались в ряде работ [4–6]. Основные параметры ФЛ по данным разных авторов несколько отличаются, что, по-видимому, связано с различиями в процедуре очистки и наличием тех или иных примесей в препаратах ферментов. Спектр ФЛ растворов используемого нами препарата аргиназы печени быка при  $\lambda_{\text{возб}}=297\text{нм}$  имеет максимум при 338нм (рис. 1), что было показано ранее [6, 7]. Из рисунка видно, что интенсивность ФЛ при  $\lambda_{\text{возб}}=280\text{нм}$  значительно выше, чем при  $\lambda_{\text{возб}}=297\text{нм}$ , а максимум смещен на 1–2нм. Это свидетельствует о том, что, хотя остатки тирозина вносят вклад в процессы флуоресценции аргиназы при  $\lambda_{\text{возб}}=280\text{нм}$ , в спектрах ФЛ определя-

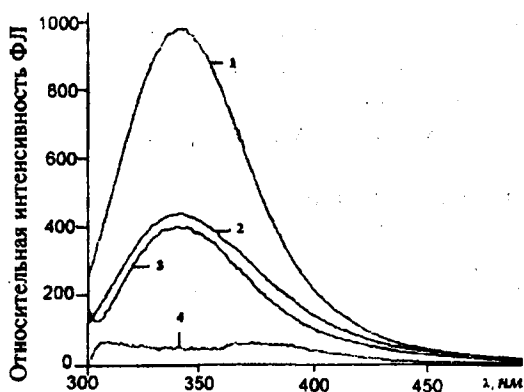


Рис. 1. Спектры ФЛ раствора аргиназы (рН 6, концентрация –  $4 \cdot 10^{-7}\text{М}$ ) при  $\lambda_{\text{возб}}=280\text{нм}$  (1), 257нм (2), 297нм (3); разностный спектр ФЛ (4).

ющей является триптофановая компонента. Были измерены спектры ФЛ растворов аргиназы при  $\lambda_{\text{возб}}=257\text{нм}$ , когда кроме остатков триптофана и тирозина энергию поглощают также и остатки фенилаланина. Количество этих аминокислотных остатков в аргиназе печени быка, согласно литературным данным [8], составляет 36 остатков на молекулу фермента.

Спектр ФЛ раствора аргиназы (рН 6) при  $\lambda_{\text{возб}}=257\text{нм}$  (рис. 1, кр.2) по форме и положению максимума сходен со спектром ФЛ при  $\lambda_{\text{возб}}=297\text{нм}$  (кр. 3). Интенсивность этой ФЛ почти вдвое меньше, чем при  $\lambda_{\text{возб}}=280\text{нм}$  (кр.1) и несколько больше, чем интенсивность ФЛ при  $\lambda_{\text{возб}}=297\text{нм}$ . Основными центрами ФЛ аргиназы и в этом случае являются остатки триптофана, однако определенный вклад в эти процессы, по-видимому, вносят и остатки тирозина. По кривой 4, представляющей собой разность между спектрами 2 и 3, можно оценить вклад остатков тирозина в спектр ФЛ аргиназы при  $\lambda_{\text{возб}}=257\text{нм}$  в данных условиях. Так как остатки фенилаланина в исследуемой области спектра не флуоресцируют, можно предположить, что энергия, поглощенная этими аминокислотными остатками при  $\lambda_{\text{возб}}=257\text{нм}$ , мигрирует внутри белковой молекулы на основные флуоресцирующие центры аргиназы. Взаимное расположение хромофоров в аргиназе, возможно, способствует переносу поглощенной энергии на находящиеся в непосредственной близости остатки триптофана или тирозина. Необходимо учитывать также, что в белках имеет место тушение ФЛ целым рядом контактирующих с хромофорами функциональ-

ных групп, среди которых аминогруппы, карбоксильные, сульфгидрильные группы и др. [1].

При изменении рН среды, при взаимодействии с ГА и в результате длительного диализа наблюдается изменение интенсивностей ФЛ растворов

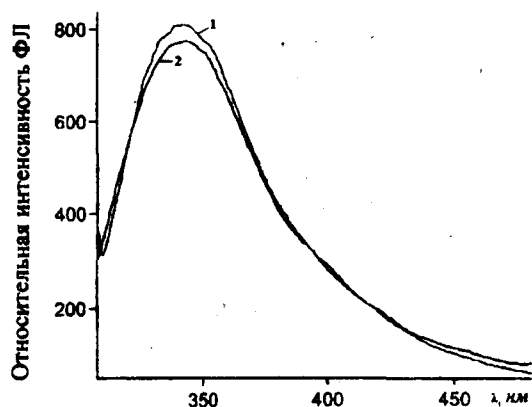


Рис. 2. Спектры ФЛ раствора аргиназы (рН 6, концентрация –  $8 \cdot 10^{-7} M$ ) после взаимодействия с ГА в течение 60 минут при  $\lambda_{\text{возб}}=297 \text{ нм}$  (1) и  $257 \text{ нм}$  (2).

аргиназы при  $\lambda_{\text{возб}}=257$  и  $297 \text{ нм}$ , а положение максимумов спектров ФЛ не меняется. На рис. 2 показаны спектры ФЛ растворов аргиназы после взаимодействия с ГА при рН 6. Под действием этого реагента в данных условиях, как показано ранее [7], аргиназа теряет активность. Если интенсивность триптофановой ФЛ растворов нативной аргиназы (рН 6) меньше, чем интенсивность ФЛ при  $\lambda_{\text{возб}}=257 \text{ нм}$  (рис. 1), то после взаимодействия с ГА соотношение интенсивностей

меняется (рис. 2). В таблице приведены значения отношений интенсивностей ФЛ в максимуме при различных воздействиях на аргиназу.

*Влияние рН раствора аргиназы, взаимодействия с ГА и диализа на величину отношения интенсивностей ФЛ в максимуме при  $\lambda_{\text{возб}}=257$  и  $297 \text{ нм}$*

Условия	рН 6	рН 8,6	ГА, рН 6	Диализ, рН 6
$I_{257}^{\text{max}}/I_{297}^{\text{max}}$	1,06	0,98	0,96	1,14

Из таблицы видно, что с увеличением значений рН раствора аргиназы, а также в результате взаимодействия с ГА указанное отношение интенсивностей ФЛ несколько уменьшается. После диализа оно возрастает по сравнению с результатами, полученными для нативного фермента. Диализ также приводит к инактивации аргиназы в результате удаления катионов марганца, которые, как известно, играют важную роль в проявлении активности этого фермента [8]. Эти данные свидетельствуют о том, что под действием ГА, в результате диализа, а также при изменении значений рН растворов аргиназы происходит нарушение конформации белка и изменение микроокружения флуоресцирующих остатков триптофана, тирозина, а также, по-видимому, и поглощающих энергию при  $\lambda_{\text{возб}}=257 \text{ нм}$  остатков фенилаланина. Изменения, происходящие во взаимном расположении этих аминокислотных остатков, очевидно, также могут оказывать влияние на процессы ФЛ аргиназы, затрудняя или облегчая перенос энергии с одних остатков на другие. Определенное влияние может оказывать также и перегруппировка подавляющих ФЛ групп.

Таким образом, наиболее удобным параметром, позволяющим оценить изменения микроокружения хромофоров при различных воздействиях на

белок, очевидно, является отношение интенсивностей ФЛ в максимуме ( $I_{257}^{\max}/I_{297}^{\max}$ ). Легко контролируемые изменения этих интенсивностей, как показывают полученные данные, позволяют регистрировать небольшие нарушения конформации белков, а также в сочетании с другими современными методами исследования структуры макромолекул получить сведения об изменениях взаимного расположения отдельных аминокислотных остатков, происходящих при различных воздействиях на белковую молекулу.

Кафедра биохимии

Поступила 27.10.2004

## ЛИТЕРАТУРА

1. Бурштейн Э.А. – Молек. биол., 1983, т. 17, № 3, с. 455–467.
2. Решетняк Я.К., Бурштейн Э.А. – Биофизика, 1997, т. 42, № 2, с. 293–300.
3. Сетлоу Р., Поллард Э. Молекулярная биофизика. М.: Мир, 1964.
4. Rossi V., Grandi C., Dalzoppo D., Fontana A. – Int. J. Peptide Protein Res., 1983, v. 22, p. 239–250.
5. Burstein E.R., Vedenkina N.S., Ivkova M.N. – Photochem. Photobiol., 1973, v. 18, p. 263–279.
6. Геворкян М.Л., Давтян М.А. – Ученые записки ЕГУ, 2002, № 3, с. 85–90.
7. Геворкян М.Л. – ДНАН Армении, 2005, т. 105, № 1.
8. Harell D., Sokolovsky M. – Eur. J. Biochem., 1972, v. 25, № 1, p. 102–108.

Մ. Լ. ԳԵՎՈՐԳՅԱՆ, Մ. Ա. ԴԱՎԹՅԱՆ

## ԱՐԳԻՆԱԶԻ ՖԼՈՒՐԵՍԵՆՑԻԱՅԻ ՈՐՈՇ ԱՌԱՆՁՆԱՀԱՏԿՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ՄԱՍԻՆ

### Ամփոփում

Արգինազի լուծույթները ուլտրամանուշակագույն լույսով (257 և 297 նմ) գրգռելիս ստացված ֆլուորեսցենցիայի (ՖԼ) սպեկտրները ձևով և մաքսիմումի դիրքով մնան են իրար: Միջավայրի pH-ի փոփոխության դեպքում, հիդրոօքսիլամինի ազդեցության արդյունքում և երկարատև դիալիզի հետևանքով դիտվում է ՖԼ-ի մաքսիմալ ինտենսիվությունների հարաբերության ( $I_{257}^{\max}/I_{297}^{\max}$ ) փոփոխությունն նշված գրգռման ալիքների դեպքում, ինչը կապված է, հավանաբար, արգինազի մոլեկուլի կազմի մեջ մտնող արոմատիկ ամինաթթվային մնացորդների վրա միջավայրի տարբեր պայմանների ազդեցության հետ:  $\lambda_{գրգռմ.}=257$  և  $297$  նմ ալիքների ազդեցությամբ առաջացած ՖԼ սպեկտրների համեմատական ուսումնասիրությունները կարող են օգտագործվել որպես լրացուցիչ զգայուն մեթոդ՝ սպիտակուցների մոլեկուլների կոնֆորմացիայի նուրբ փոփոխությունների մասին նոր տեղեկություններ ստանալու համար:

ABOUT SOME PECULIARITIES OF ARGINASE FLUORESCENCE

Summary

The fluorescence spectrum of bovine liver arginase excited at  $257nm$  is similar to that of excited at  $297nm$ . The alteration of pH values, hydroxylamine treatment and prolonged dialysis leads to the changes in the ratio of fluorescence maximal intensities at mentioned excitation wavelengths ( $I_{257}^{max}/I_{297}^{max}$ ), which reflects, probably the alteration of microenvironment of aromatic amino acids residues in arginase. The comparative study of the fluorescence spectra of protein solutions at the excitation wavelength  $257$  and  $297nm$  can be used as a sensitive method to receive new information about small conformational changes of protein molecules.