



УДК 577.322.5:535.37

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ УФ-ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ АЗУРИНА
НА ОСНОВЕ ДАННЫХ РЕНТГЕНОСТРУКТУРНОГО АНАЛИЗА

Туроверов К. К., Кузнецова И. М., Зайцев В. Н.*

Институт цитологии Академии наук СССР, Ленинград;

* Институт кристаллографии им. А. В. Шубникова Академии наук СССР, Москва

С целью проверки и уточнения сложившихся к настоящему времени представлений о взаимосвязи характеристик собственной УФ-флуоресценции белков и свойств микроокружения отдельных триптофановых (тирозиновых и фенилаланиновых) остатков предложен метод анализа содержащейся в Protein Data Bank информации о координатах атомов отдельных белков, предусматривающий, в частности, переход к различным триптофаноцентрическим (тирозино- и фенилаланиноцентрическим) системам координат. Осуществление такого анализа применительно к структуре азурина *Pseudomonas aeruginosa* дало возможность проверить справедливость многих известных из литературы объяснений необычных флуоресцентных свойств этого белка, сделать выбор среди противоречащих друг другу заключений, а в некоторых случаях дать новую интерпретацию имеющимся экспериментальным данным.

Установлено, что микроокружение триптофанового остатка азурина сформировано в основном неполярными углеводородными группами; вблизи индольного кольца ($r < 7 \text{ \AA}$) нет полярных групп боковых цепей аминокислот; из числа полярных атомов вблизи индольного кольца есть несколько атомов кислорода и азота пептидных связей, из них лишь атом кислорода самого триптофанового остатка непосредственно контактирует с кольцом; вокруг кольца имеются полости; конформация боковой цепи является ненапряженной. Эти результаты проанализированы в связи с литературными данными об уникально коротковолновом положении спектра флуоресценции азурина и участии индольного кольца в высокочастотной подвижности значительной амплитуды. Из данных о расстояниях между тирозиновыми остатками и триптофановым и их взаимной ориентации сделан вывод о низкой эффективности переноса энергии от остатка Tyr^{72} к Trp^{48} и более чем 50%-ной эффективности переноса от Tyr^{108} к Trp^{48} . Механизм значительного возрастания интенсивности флуоресценции азурина при отщеплении меди обсуждается с учетом того, что «голубой» медьсодержащий центр удален от индольного кольца более чем на 10 \AA .

Флуоресцентные характеристики единственного триптофанового остатка азурина *Pseudomonas aeruginosa* во многом необычны и не нашли еще полного и непротиворечивого объяснения. Авторы всех работ по изучению флуоресцентных свойств азурина единодушны в том, что уникально коротковолновый ($\lambda_{\text{макс}} 308 \text{ нм}$ [1]), структурированный [2] спектр флуоресценции этого белка обусловлен исключительно гидрофобным характером микроокружения его триптофанового остатка. Авторы работы [2], однако, считают, что для возникновения такого спектра не менее существенна высокая жесткость фиксации индольного кольца. В то же время измерение временных зависимостей анизотропии флуоресценции азурина свидетельствует как раз, наоборот, о существовании высокочастотной подвижности индольного кольца значительной амплитуды [3]. Существование наносекундной подвижности боковых цепей триптофановых остатков в условиях гидрофобного микроокружения было показано нами [4] для ряда других белков методом вращательной деполяризации при стационарном возбуждении. Тем не менее вопрос о существовании внутримолекулярной подвижности триптофанового остатка в азурине остается предметом дискуссии [5, 6].

Неясен механизм влияния на флуоресцентные характеристики азурина «голубого» медьсодержащего центра: отщепление иона меди приводит к значительному [7] (по данным работ [8–10], к 6-кратному) возрастанию интенсивности флуоресценции, но не сопровождается какими-либо измене-

ниями положения спектра флуоресценции [7—10]. При этом происходит лишь незначительное изменение среднего времени жизни возбужденного состояния [8—10]. Предположение о непосредственном контакте триптофанового остатка и иона меди, выдвинутое в работах [4, 7] для объяснения тушащего действия меди в холобелке, в последующих работах не обсуждалось. В работе [10] предполагается близость индольного кольца и лигандов меди. Данные работы [11], однако, заставляют усомниться в справедливости этих предположений.

Достаточно противоречивы также представления о вкладе тирозиновых остатков в излучение белка и об эффективности переноса энергии от тирозиновых остатков к триптофановому. По мнению Бурштейна и соавт. [2], имеет место 100%-ный перенос энергии. Сабо и соавт. [10], наоборот, пришли к выводу об отсутствии переноса энергии и о значительном вкладе тирозиновых остатков во флуоресценцию.

Определение методом рентгеноструктурного анализа координат отдельных атомов макромолекулы азурина *P. aeruginosa* [11, 12] дает возможность проверить справедливость многих известных из литературы объяснений необычных флуоресцентных свойств этого белка и сделать выбор среди противоречащих друг другу объяснений, а в некоторых случаях дать новую интерпретацию имеющимся экспериментальным данным. Для этого, однако, совершенно недостаточно тех описаний структуры азурина, которые приводятся в работах [11, 12]. Необходим специальный анализ содержащейся в Protein Data Bank * информации о координатах атомов этого белка, в частности переход к различным триптофаноцентрическим системам координат, описание которых дано ниже.

Анализ данных Protein Data Bank. Построение триптофаноцентрических (тирозино- и фенилаланиноцентрических) изображений структуры белка. При изложении предлагаемого метода для краткости речь будет идти только о микроокружении триптофанового остатка, построении триптофаноцентрических изображений структуры белка, хотя аналогичный анализ может быть выполнен и для двух других аминокислотных остатков, способных флуоресцировать — тирозиновых и фенилаланиновых. При наличии в белке нескольких триптофановых (тирозиновых или фенилаланиновых) остатков аналогичные преобразования координат, графические построения и анализ могут быть проведены, если это необходимо, последовательно для каждого из них.

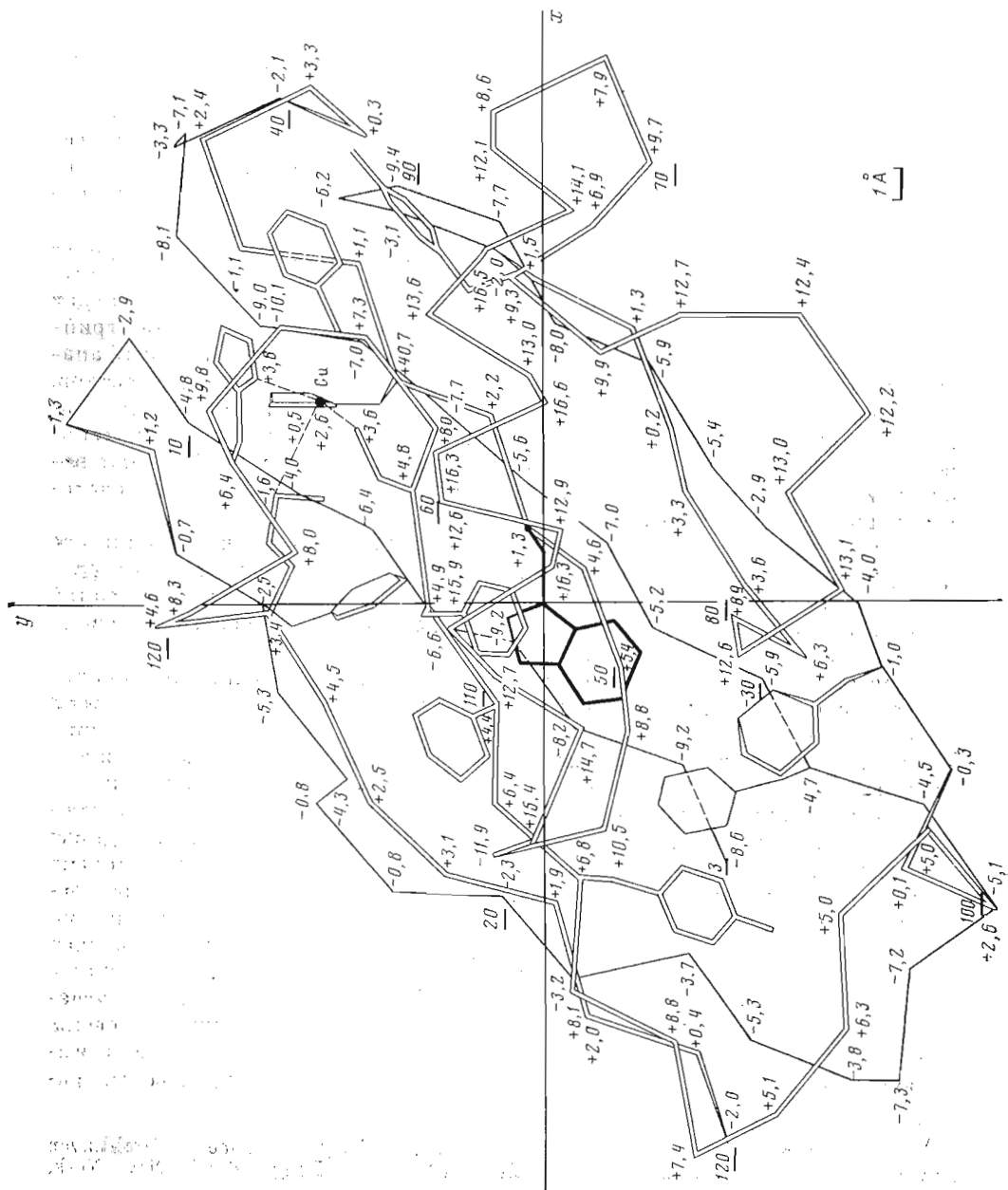
1. Удобным приемом при анализе структуры белка с точки зрения его флуоресцентных свойств является переход к декартовой системе координат с центром в точке локализации C_T -атома, осью OX , направленной вдоль связи $C_\beta-C_T$, и плоскостью XY , совпадающей с плоскостью кольца рассматриваемого триптофанового остатка.

Для того чтобы получить общее представление о локализации анализируемого остатка, преобразование координат осуществляется для всех C_α -атомов, всех атомов остатков триптофана, тирозина и фенилаланина, гетероатомов, а также некоторых других атомов, которые по тем или иным причинам для проводимого анализа представляют собой интерес (рис. 1).

Для получения представления о ближайшем микроокружении триптофанового остатка переход к триптофаноцентрической системе координат осуществляется для всех атомов, удаленных от центра индольного кольца на расстояния r меньше некоторого заданного значения r_0 . При выборе величины r_0 следует иметь в виду, что максимальное расстояние от центра индольного кольца до его периферии с учетом атомов водорода составляет 4,2 Å, а ван-дер-ваальсов радиус атомов углерода с присоединенными к ним атомами водорода равен приблизительно 2,2 Å. Отсюда следует, что углеводородная группа может контактировать с индольным кольцом своим атомом водорода в том случае, если атом углерода удален от центра индольного кольца не более чем на 6,4 Å. Различие ван-дер-ваальсовых ра-

* Адрес Prot. Data Bank: Fr. C. Bernstein, Chemistry Department, Brookhaven National Laboratory Associated Universities, INC, Upton, Long Island, New York, 11973, USA.

Рис. 1. Структура азурина в триптофанцентрической системе координат. Начало координат — точка, отвечающая локализации S_{72} -атома, ось Ox — направление связи $S_{72}-C_{71}$, плоскость XU — плоскость индольного кольца Трп⁴⁸. Полностью показаны остатки триптофана, тирозина и фенилаланина, а также боковые цепи остатков, формирующих медьсодержащий центр; для остальных остатков — S_{62} -атомы; указаны значения координат Z всех S_{62} -атомов, а также номер каждого 10-го остатка (подчеркнуты). Cu — атом меди. На этом и последующих рисунках изображение построено с использованием пленочной в работе Адмана и др. [11] и содержащейся в Protein Data Bank информации о координатах атомов белка



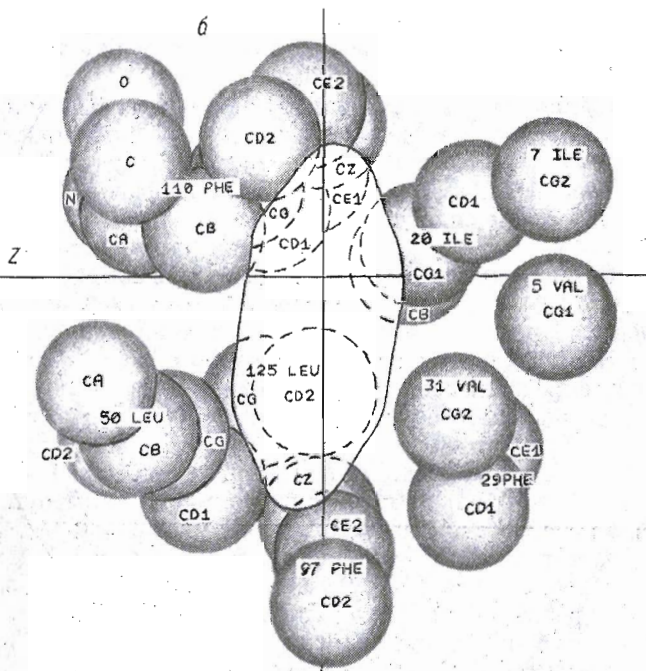
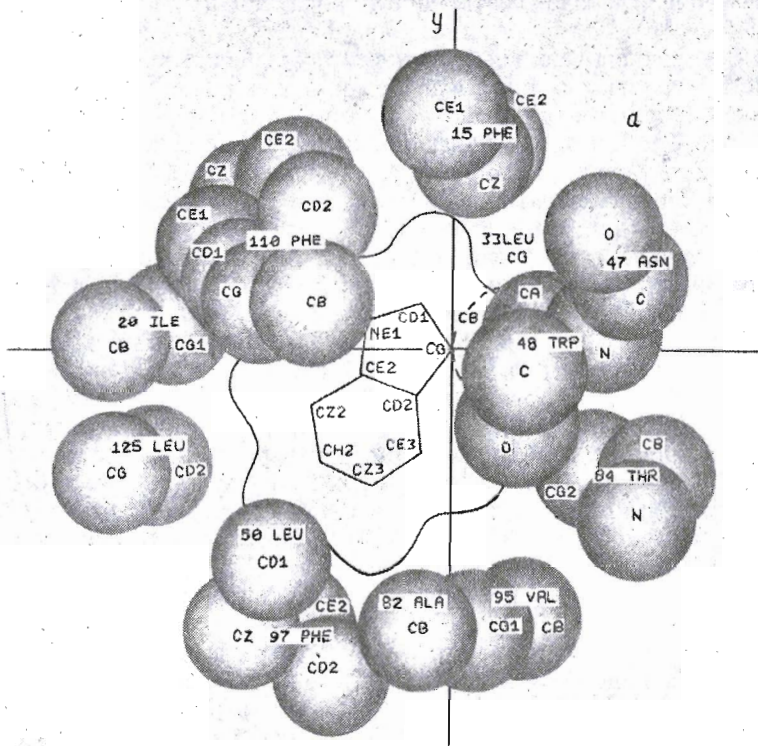
диусов атомов углерода, азота и кислорода для проводимого анализа не существенно. Чтобы при анализе наверняка учесть все атомы, контактирующие с индольным кольцом, величину r_0 выбрали равной 7 Å. Полученные данные используются для построения изображений участка структуры макромолекулы белка, непосредственно примыкающего к индольному кольцу (рис. 2). На рис. 2 показано, какие атомы, группы атомов и аминокислотные остатки в целом входят в состав ближайшего микроокружения триптофанового остатка, насколько эти группы могут препятствовать вращательному движению (поворотной изомеризации и крутильным колебаниям) кольца относительно связи C_6-C_7 (наиболее вероятный механизм внутримолекулярной подвижности, проявляющейся в деполаризации собственной УФ-флуоресценции [13], см. также [6]).

2. Необходимо учитывать, что индольное кольцо асимметрично и поэтому атомы, находящиеся на одинаковом расстоянии от центра индольного кольца, могут на самом деле существенно различаться по их удаленности от кольца. Для выявления атомов, непосредственно контактирующих с индольным кольцом, необходимо определить расстояние между всеми атомами с $r \leq r_0$ и каждым из атомов индольного кольца (см. табл. 1). При анализе этих данных следует иметь в виду, что максимальное расстояние, при котором группы OH, NH, SH, SH_2 , SH_3 могут контактировать с кольцом своими атомами водорода, составляет 4,4 Å, а минимальное, при котором атомы N, O и S непосредственно контактируют с атомами индольного кольца, — 2,6 Å [14].

3. Из литературы (см., например, сводку данных в [15]) известно, сколь существенное влияние на различные флуоресцентные характеристики триптофанового остатка могут оказывать отрицательно заряженные карбоксильные группы глутаминовой и аспарагиновой кислоты, положительно заряженные амино- и гуанидиновые группы остатков лизина и аргинина, атомы серы цистеина и метионина, остатки гистидина и т. д. В связи с этим предлагаемый метод предусматривает определение удаленности этих групп от геометрического центра триптофанового остатка, флуоресцентные свойства которого анализируются вне зависимости от величины r (табл. 2).

4. Рассмотренные выше изображения структуры микроокружения триптофанового остатка не дают, однако, полного представления о том, на каком расстоянии в выбранном направлении находится ближайший к геометрическому центру индольного кольца атом, насколько каждый из таких атомов экранирован от кольца другими атомами, расположенными ближе к нему, есть ли вокруг кольца пространство, не занятое атомами (полости), т. е. насколько плотна упаковка микроокружений. Для получения такой информации удобно спроецировать все атомы микроокружения на единичную сферу в триптофаноцентрической системе координат с началом координат в геометрическом центре индольного кольца. Для всех атомов с r меньше r_0 определяются азимутальный угол φ и полярный угол θ , а также радиус шарового сегмента, вырезаемого на единичной сфере телесным углом, под которым этот атом с учетом его ван-дер-ваальсового радиуса виден из центра кольца. Очевидно, что, чем ближе к центру кольца расположен атом, тем больше соответствующий телесный угол и тем больше радиус шарового сегмента. На плоскости изображение этой сферы может быть представлено двумя поперечными и двумя нормальными ортогональными проекциями [16] (рис. 3; здесь $\theta = 90^\circ - \theta$), которые получаются путем проецирования поверхности сферы соответственно на меридиональную и экваториальную плоскости лучами, перпендикулярными к этим плоскостям.

5. Предлагаемый анализ данных Protein Data Bank предусматривает определение величин торсионных углов χ_1 и χ_2 боковой цепи рассматриваемого триптофанового остатка. Эти данные представляют интерес по крайней мере в связи с работами [17, 18], в которых было предположено существенное различие времён жизни возбужденного состояния для различных ротамеров триптофанового остатка. Не исключено, что конформация боковой цепи может являться фактором столь же существенным и для других



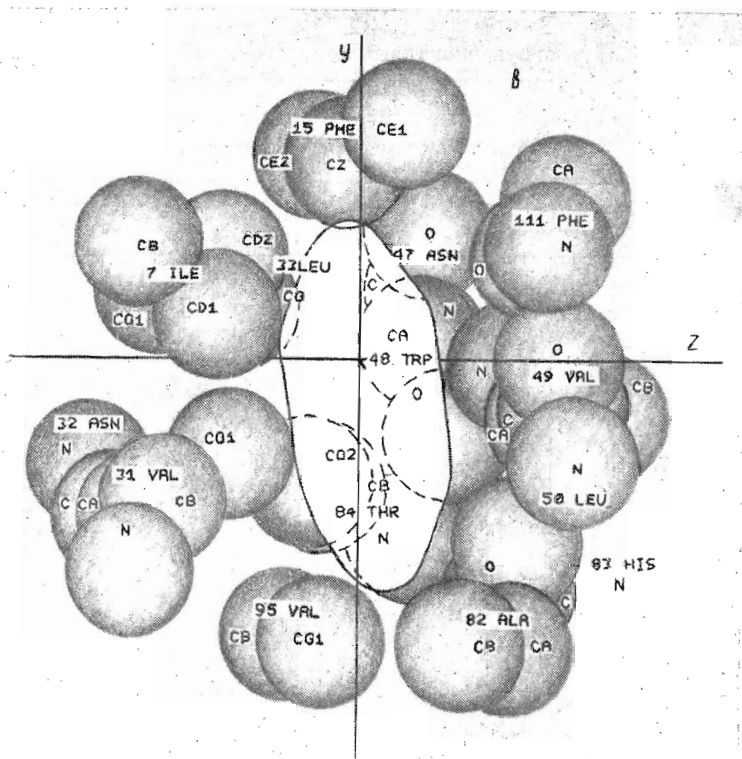


Рис. 2. Микроокружение триптофанового остатка азурина. Представлены атомы, находящиеся на расстоянии $r \leq 7 \text{ \AA}$ от геометрического центра индольного кольца. Ван-дер-ваальсов радиус атомов принят равным $1,5 \text{ \AA}$. *a* — проекция на плоскость XY (показаны лишь атомы, для которых $|Z| \leq 3 \text{ \AA}$); *b* и *c* — проекции на плоскость YZ для атомов с $X \leq X_0$ и $X \geq X_0$ соответственно (X_0 — координата геометрического центра индольного кольца в выбранной триптофанцентрической системе координат; $X_0 = -1,7 \text{ \AA}$). Значения координат X и Z атомов микроокружения см. табл. 1. Здесь и в табл. 1 атомы C_{α} , C_{β} , C_{γ} , C_{δ} , C_{ϵ} , C_{ζ} обозначены как CA, CB, CG, CD, CZ

характеристик флуоресценции триптофановых остатков, а также для существования внутримолекулярной подвижности индольного кольца.

6. Для оценки эффективности переноса энергии возбуждения между остатками фенилаланина, тирозина и триптофана, который может существенно влиять на все регистрируемые экспериментально параметры флуоресценции, анализ данных Protein Data Bank предусматривает определение попарных расстояний между геометрическими центрами колец триптофановых, тирозиновых и фенилаланиновых остатков и углов, характеризующих взаимную ориентацию осцилляторов остатков донора и акцептора энергии возбуждения.

Флуоресцентные свойства и локализация триптофанового остатка в структуре макромолекулы азурина. Свойства микроокружения триптофанового остатка азурина: положение спектра флуоресценции и подвижность индольного кольца. В непосредственном контакте с индольным кольцом единственного триптофанового остатка 48 в азурине находятся углеводородные неполярные группы атомов (табл. 1, рис. 2). Исключение составляет лишь атом кислорода основной цепи самого триптофанового остатка. Атомы азота остатков Trp⁴⁸, Val⁴⁹ и атом кислорода Ala⁸², хотя и находятся от ближайших атомов кольца на расстоянии $r \leq 4,4 \text{ \AA}$, с кольцом не контактируют. Атомы $C_{\epsilon 2}$ и C_{ζ} (Phe¹⁵), C_{β} (Ala⁸²), $C_{\epsilon 2}$ (Phe³⁷), $C_{\delta 2}$ (Leu¹²⁵) и некоторые другие (см. табл. 1) контактируют с кольцом по его периферии и не могут препятствовать поворотам кольца вокруг связи C_{β} — C_{γ} . В непосредственном контакте с плоскостью индольного кольца находятся атомы $C_{\delta 1}$ (Ile⁷), C_{γ} и $C_{\delta 1}$ (Leu⁵⁰), C_{β} , C_{γ} , $C_{\delta 1}$ и $C_{\delta 2}$ (Phe¹¹⁰), C_{β} , $C_{\gamma 1}$ и $C_{\gamma 2}$ (Val³¹)

Микроокружение триптофанового остатка азурина *

АМИНОКИСЛОТНЫЙ ОСТАТОК	АТОМ	Расстояние, Å									Координаты в триптофановоцентрической системе координат, Å		
		до центра индольного кольца	до ближайших атомов индольного кольца										
			C _γ	C _{δ1}	C _{δ2}	N _{ε1}	C _{ε2}	C _{ε3}	C _{ζ2}	C _{ζ3}	C _{H2}	X	Y
Val ⁵	C _{γ1}	6,1						5,9			-4,2	-1,1	-5,6
	C _β	6,5		5,5						-1,4	2,7	-5,3	
	C _{γ1}	5,6		4,8						-0,4	1,6	-4,8	
Ile ⁷	C _{γ2}	6,5		6,0						-2,8	2,2	-5,5	
	C _{δ1}	4,1	3,7	3,4	4,2	3,6	4,2			-0,7	1,1	-3,4	
	C _{ε1}	6,8		4,5						-0,2	5,5	1,1	
Phe ¹⁵	C _{ε2}	6,4		4,1						0,8	4,8	-1,0	
	C _z	6,1		3,7						0,5	4,6	0,3	
	C _β	7,0						5,6		-8,2	0,3	-2,1	
Ile ²⁰	C _{γ1}	5,9						4,7		-6,8	0,7	-2,4	
	C _{δ1}	6,6				5,7				-6,6	1,7	-3,6	
	C _{ε1}	6,8							5,3	-5,6	-5,4	-3,5	
Phe ²⁹	C _{δ1}	6,4							5,1	-5,8	-4,1	-3,8	
	C _{ε1}	6,8								-1,4	-5,0	-5,4	
	N	6,8						6,2		-1,0	-3,7	-5,2	
Val ³¹	C _α	5,9						5,7		-1,0	-3,7	-5,2	
	C	6,7						6,3		0,5	-3,7	-5,8	
	C _β	4,5						4,2		-1,1	-3,4	-3,7	
Asn ³²	C _{γ1}	3,7	3,9		3,6		4,2	3,4		4,0	-0,2	-2,3	-3,1
	C _{γ2}	4,0			4,3		4,3		4,1	3,7	-2,5	-3,3	-3,2
	N	7,0						6,8		0,7	-2,5	-6,4	
Leu ³³	C _γ	6,5	4,8							3,6	1,2	-3,0	
	C _{δ2}	6,4	4,8							2,7	2,4	-3,2	
	C	6,7	4,8							4,2	1,6	1,7	
Asn ⁴⁷	O	6,7	4,8							3,6	2,7	1,7	
	N	5,8	4,0							3,7	0,4	1,5	
	C _α	4,3	2,6	3,3	3,6			4,2		2,2	0,4	1,3	
Trp ⁴⁸	C	4,2	3,0	3,9	3,5			3,8		1,7	-0,6	2,5	
	O	4,0	3,2	4,3	3,3			3,1		1,6	-1,6	2,2	
	C _β	3,4	1,6	2,6	2,7	3,8	3,8	3,4	4,2	1,6	0,0	0,0	
Val ⁴⁹	N	5,0	4,0		4,4					1,5	-0,2	3,7	
	C _α	5,5						4,9		1,2	-1,4	4,7	
	O	5,1			4,8					-0,4	-1,2	4,9	
Leu ⁵⁰	O	4,9			4,7					-0,8	-0,1	4,8	
	C _β	7,0	6,4							2,1	-1,4	5,8	
	N	5,3						4,8		-0,9	-2,4	5,1	
Ala ⁸²	C _α	5,6								-2,3	-2,5	5,4	
	C _β	5,2							5,0	4,1	4,1	4,4	
	C _γ	5,2						4,4	4,4	4,1	3,7	-2,9	
His ⁸³	C _{δ1}	5,6								4,0	3,7	-4,2	
	C _{δ2}	6,6								4,0	3,7	-4,4	
	C _α	6,9								5,0	5,0	-5,4	
Thr ⁸⁴	C	6,2						4,8		5,2	5,2	0,1	
	O	5,4						4,1		4,3	4,3	0,9	
	C _β	6,1								4,1	4,1	0,4	
Val ⁹⁵	N	7,0						5,4		4,1	4,1	-0,9	
	N	7,0						5,5				2,2	
	C _β	7,0						5,8				-5,7	
Phe ⁹⁷	C _{γ2}	5,6						4,4				4,4	
	C _β	6,5						5,1				4,4	
	C _{γ1}	6,1								4,4	4,4	1,7	
Phe ¹¹⁰	C _{δ2}	6,7								4,6	4,6	0,5	
	C _{ε2}	5,8								3,9	3,9	-2,9	
	C _z	6,5										-7,6	
Phe ¹¹⁰	N	6,4				5,7						4,0	-3,8
	C _α	5,3				4,7						4,4	-6,5
	C	6,0				5,2							-5,1
	O	7,0				5,9							-6,6
	C _β	4,0	4,0	4,4	3,3	3,5		3,7					-6,4
	C _γ	4,8	3,9		3,1	3,7		3,8					-6,4
	C _{δ1}	4,5			3,4	3,8		3,5					-1,8
	C _{δ2}	4,8	3,6		3,2	4,1							-0,9
	C _{ε1}	5,3			4,0			4,3					-0,3
	C _{ε2}	5,5	4,2		3,8								-0,3
	C _z	5,5			4,0								0,0

АМИНОКИСЛОТНЫЙ ОСТАТОК	АТОМ	Расстояние, Å									Координаты в триптофан-центрической системе координат, Å			
		до центра индольного кольца	до ближайших атомов индольного кольца								X	Y	Z	
			C _γ	C _{δ1}	C _{δ2}	N _{ε1}	C _{ε2}	C _{ε3}	C _{ζ2}	C _{ζ3}				C _{H2}
Phe ¹¹¹	N	5,8										-1,3	2,6	4,5
	C _α	7,0	4,8									-0,4	3,7	4,9
	O	6,3	5,6									1,5	2,4	4,2
Leu ¹²⁵	C _γ	6,9	4,9									-8,2	-2,9	1,5
	C _{δ2}	5,8						4,1			4,1	-7,3	-2,7	0,2

* Приведены значения r до всех атомов кольца, если $r \leq 4,4$ Å, в остальных случаях — расстояние до ближайшего атома кольца.

(рис. 2). Высокочастотную подвижность индольного кольца значительной амплитуды, обнаруженную путем измерения временных зависимостей анизотропии излучения [3], можно представить, лишь предположив совместное его перемещение с этими группами атомов. Для объяснения обнаруженной в работе [3] деполяризации со временем корреляции 0,5 нс необходимо допустить существование крутильных колебаний индольного кольца относительно связи C_β—C_γ с амплитудой ~30° (см. [6]), что возможно при линейных перемещениях находящихся в контакте с кольцом атомов на 1,0 Å. Ниже будет приведен ряд соображений в пользу того, что нет достаточных оснований исключить возможность такой подвижности.

Из данных табл. 2 следует, что в радиусе 7 Å от геометрического центра индольного кольца нет ни одной полярной группы боковых цепей. Лишь полярные гидроксильные группы остатков Thr^{17, 30, 84}, Ser⁹⁴ и амидная группа Asn³² расположены на расстоянии $r < 10$ Å от центра кольца. Для атомов кислорода и азота этих групп значения углов ϕ и θ составляют 76, 280, 355, 320, 310 и -24, -28,5, -1,4, 33, -43° соответственно. Таким образом, индольное кольцо экранировано от всех этих групп, за исключением гидроксильной группы остатка Thr¹⁷, близлежащими неполярными углеводородными группами (рис. 3). Все эти данные хорошо согласуются с выводом об исключительной гидрофобности микроокружения триптофанового остатка, сделанного на основании феномена уникально коротковолнового положения спектра флуоресценции азурина ($\lambda_{\text{макс}}$ 308 нм [41]). Следует, однако, отметить, что в состав непосредственного микроокружения индольного кольца входит значительное число высокополярных атомов азота и кислорода пептидных групп основной цепи (9 атомов азота и 6 атомов кислорода с $r \leq 7$ Å; табл. 1). Некоторые из них удалены от атомов индольного кольца на расстояние $r \leq 4,4$ Å. Этот результат представляет интерес, поскольку не исключено, что пептидные группы основной цепи наряду с полярными группами боковых цепей аминокислотных остатков могут влиять на положение спектра флуоресценции и другие характеристики флуоресценции триптофановых остатков.

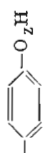
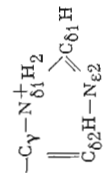
Наличие вокруг индольного кольца обширной гидрофобной области может, на наш взгляд, объяснить также и значительную подвижность в боковой цепи триптофанового остатка азурина. Гидрофобные взаимодействия в отличие от взаимодействий полярных групп не носят парного характера, и замена одной из контактирующих групп на другую не требует значительных затрат энергии. Отсюда следует значительная внутримолекулярная подвижность во внутренних гидрофобных областях макромолекул некоторых белков. В наших работах [4, 6] приводятся экспериментальные результаты, полученные методом вращательной деполяризации собственной УФ-флуоресценции, свидетельствующие в пользу справедливости этого положения. Конечно, следует помнить, что внутренние гидрофобные области могут быть стабилизированы взаимодействиями пептидных групп, определяющими вторичную структуру макромолекул белка.

Не исключено, что условием возникновения столь коротковолнового, как у азурина, спектра флуоресценции, а возможно, и существования

Расстояние от полярных групп боковых цепей аминокислотных остатков азуррина до геометрического центра индольного кольца триптофанового остатка (А) *

	№	6	11	23	55	62	69	71	76	77	93	98
Карбоксильная группа	аспарагиновой кислоты	$\text{—C}_\gamma \begin{matrix} \diagup \text{O}^- \\ \diagdown \text{O}_{\delta 1} \end{matrix}$	41,5	49,7	17,4	20,3	21,7	13,8	18,4	15,2	10,9	16,2
	глутаминовой кислоты	$\text{—C}_\delta \begin{matrix} \diagup \text{O}^- \\ \diagdown \text{O}_{\epsilon 2} \end{matrix}$	91	104	106							
Гуанидиновая группа	аргинина	$\text{—N}_\epsilon \text{H} \text{—C} \begin{matrix} \diagup \text{N}^+ \text{H}_2 \text{N}_3 \\ \diagdown \text{N}^+ \text{H}_1 \text{H} \end{matrix}$	79									
			18,0									
Аминогруппа	лизина	$\text{—N}^+ \text{Z} \text{H}_3$	24	27	41	70	74	85	101	103	122	128
			49,9	(C ₇) 19,1	19,6	24,0	20,7	(C ₇) 13,7	(C ₇) 13,4	(C ₆) 13,2	(C ₇) 11,9	(C ₆) 16,7
Амидная группа	аспарагина	$\text{—C}_\gamma \begin{matrix} \diagup \text{N}_{\delta 2} \text{H} \\ \diagdown \text{O}_{\delta 1} \end{matrix}$	10	16	18	32	38	42	47			
	глутамина	$\text{—C}_\delta \begin{matrix} \diagup \text{N}_{\epsilon 2} \text{H} \\ \diagdown \text{O}_{\epsilon 1} \end{matrix}$	17,7	11,2	12,6	9,7	(C ₆) 23,1	22,0	40,7			
		8	12	14	28	57	107					
		14,2	20,7	17,4	15,4	(C ₇) 18,7	13,6					

Таблица 2 (окончание)

Атомы серы	цистеина —S _γ H	№	3	26	112							
		R _{S_γ}	14,7	14,9	10,6							
метионина	—S _δ —C _ε H	№	13	44	56	64	109	121				
		R _{S_δ}	17,9	16,7	11,7	17,3	12,3	11,0				
		№	4	25	34	51	66	78	89	94	100	118
Гидроксильная группа	серина —O _γ H	R _{O_γ}	11,9	21,2	13,6	11,2	17,5	17,8	48,9	9,8	(C _α) 13,0	
		№	17	21	30	52	61	84	96	113	124	126
		R _{O_γ1}	7,8	12,2	9,5	14,0	19,0	7,1	11,6	40,5	11,0	12,6
Тирозин		№	72	108								
		R _{O_z}	19,5	13,5								
		центр кольца	17,2	11,3								
Гистидин		№	35	46	83	117						
		R _{N_δ1}	13,9	11,8	10,6	13,9						
		центр кольца	14,7	12,1	10,7	15,0						

* № — номер остатка, R с индексом — расстояние до соответствующего атома; в том случае, если координаты этого атома неизвестны из кристаллографических данных, в таблице приведено расстояние до наиболее удаленного по боковой цепи атома, информация о котором имеется в Protein Data Bank; в скобках дано название этого атома.

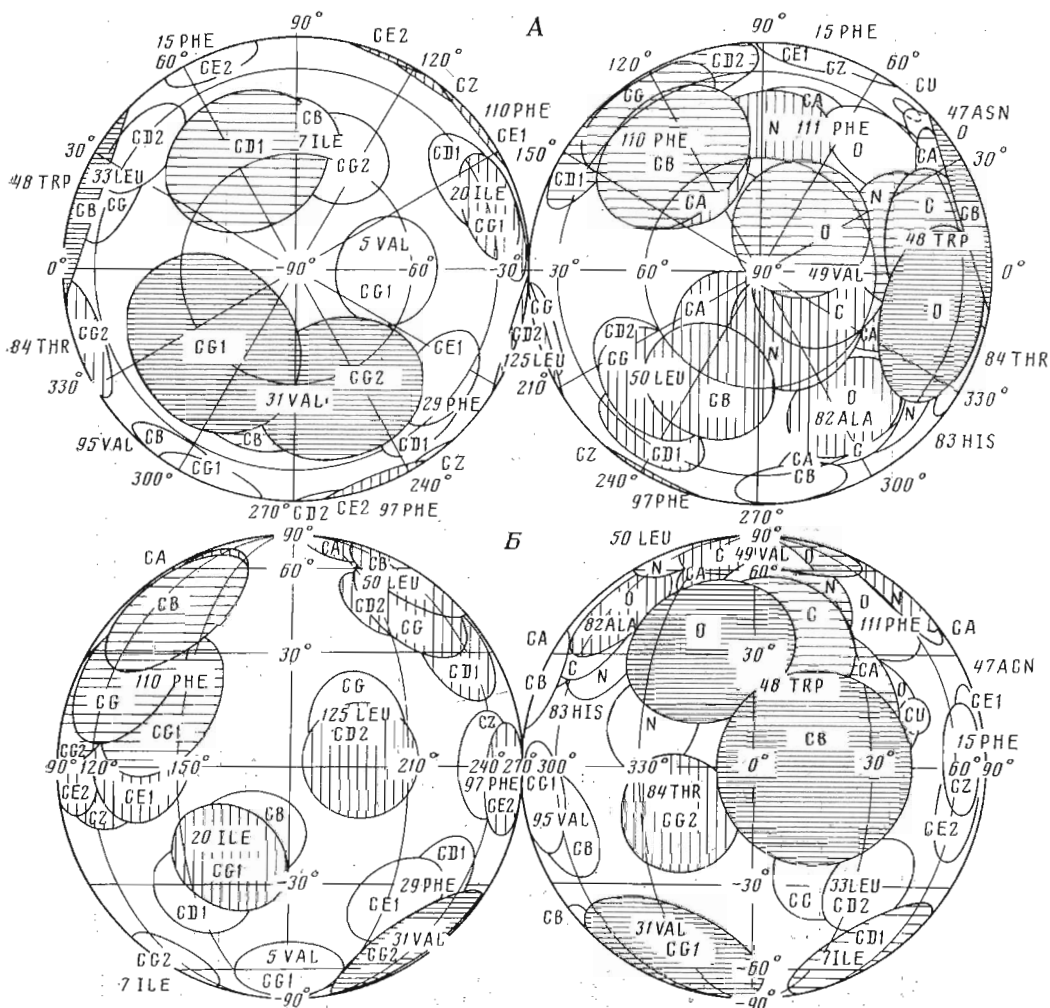


Рис. 3. Изображение атомов микроокружения триптофанового остатка азурина на единичной сфере с центром, совпадающим с геометрическим центром индольного кольца. *а* и *б* – ортографические проекции сферы на меридиональную и экваториальную плоскости. Различной штриховкой показаны атомы, находящиеся на расстоянии $r \leq 4$ (наиболее частая горизонтальная штриховка), 5 (горизонтальная штриховка), 6 (вертикальная штриховка), 7 *А* (не заштрихованы) от центра индольного кольца. На координатной сетке указаны полярные и азимутальные углы в сферической системе координат. Азимутальный угол отсчитывается от направления связи $C_{\beta} - C_{\gamma}$, полярный – от плоскости индольного кольца.

внутримолекулярной подвижности значительной амплитуды является также ненапряженная конформация боковой цепи триптофанового остатка. Именно такая ситуация имеет место в случае триптофанового остатка азурина ($\chi_1 = 177^\circ$ (*t*-изомер); $\chi_2 = 73^\circ$).

Ортографические проекции единичной сферы, на которую спроецированы атомы ближайшего микроокружения триптофанового остатка, представленные на рис. 3, свидетельствуют о том, что упаковка ближайшего микроокружения индольного кольца не является плотной. Вокруг кольца имеются полости. Существование полостей вокруг индольного кольца в азурине согласуется с установленным в работе Ляковича и Вебера [19] эффектом тушения флуоресценции азурина кислородом с константой, сравнимой по величине с константами тушения белков со значительно более длинноволновым положением спектра флуоресценции. Низкие значения констант тушения флуоресценции азурина нодистым калием [20] и акриламидом [9], а также недоступность триптофанового остатка молекулам воды (о чем свидетельствует уникально коротковолновое положе-

ние спектра флуоресценции) обусловлены, по-видимому, как более значительным размером этих молекул по сравнению с O_2 , так и низким сродством молекул H_2O , KI и акриламида к углеводородной матрице, окружающей индолное кольцо.

Наличие вскруг триптофанового остатка азурина полостей, несомненно, следует рассматривать как фактор, благоприятствующий возникновению в макромолекуле азурина внутримолекулярной подвижности.

Безызлучательный перенос энергии от тирозиновых остатков к триптофановому. Эффективность безызлучательного переноса энергии по индуктивно-резонансному механизму между молекулами донора и акцептора энергии, находящимися друг от друга на расстоянии R , может быть оценена с помощью соотношения

$$W = \frac{1}{1 + \frac{2}{3k^2} \left(\frac{R}{R_0}\right)^6}, \quad (1)$$

которое легко получить из работы [24]. R_0 — расстояние между донором и акцептором, при котором для системы молекул донора и акцептора, участвующих в быстром хаотическом броуновском вращательном движении, вероятность переноса $W=0,5$ (в этом случае $k^2=k^2=2/3$); k^2 — фактор, учитывающий взаимную ориентацию донора и акцептора [22].

$$k^2 = (\cos \theta - 3 \cos \theta_A \cos \theta_D)^2. \quad (2)$$

Здесь θ — угол между направлениями осцилляторов излучения и поглощения соответственно молекул донора и акцептора; θ_A и θ_D — углы между направлением указанных осцилляторов и вектором, соединяющим эти молекулы.

При проведении расчета эффективности переноса энергии от тирозиновых остатков к триптофановому в макромолекуле азурина было принято, что осциллятор длинноволновой полосы поглощения тирозинового остатка направлен вдоль оси симметрии фенольного кольца [23], направление осциллятора 1L_a , ответственного за длинноволновую полосу поглощения триптофанового остатка [24], составляет угол 60° с направлением связи $C_\beta-C_\gamma$ (последнее следует из данных работ [25–27]; см. также рис. 2 в [6]). Расчет проводился в рамках модели неподвижных, строго ориентированных осцилляторов; величина R_0 была принята равной соответствующему значению для пары тирозин — триптофан в водном растворе: 13–15 Å [28]. Значения величин R , θ , θ_A и θ_D , определенные нами из рентгеноструктурных данных, а также вычисленные на их основании величины k^2 и W , приведены в табл. 3. Совершенно очевидно, что представление авторов работы [2] о том, что индолное кольцо триптофанового остатка зажато между фенольными кольцами тирозиновых остатков, неверно (рис. 1). Результаты расчета W свидетельствуют об ошибочности заключения авторов этой работы о 100%-ном переносе энергии от тирозиновых остатков к триптофановому. Вероятность переноса от остатка Tyr^{72} оказалась очень низкой; расстояние между центрами колец остатков Trp^{48} и Tyr^{108} меньше R_0 , а взаимная ориентация осцилляторов донора и акцептора такова, что величина k^2 не намного меньше $2/3$ и вероятность безызлучательного переноса энергии для пары $Tyr^{108}-Trp^{48}$ несколько выше 50%. Этот результат расходится с предположением авторов работы [10] о полном отсутствии тирозин-триптофанового переноса энергии в азурине.

Необходимо отметить, что хотя, по нашему мнению, приведенные выше оценки эффективности переноса энергии отражают реально существующую ситуацию, они являются достаточно приблизительными по следующим причинам: 1) в качестве направления между донором и акцептором было принято направление между геометрическими центрами фенольного и индольного колец, хотя, строго говоря, выбор точек приложения вектора, соединяющего донор и акцептор, неясен; 2) точность определения направления осциллятора 1L_a относительно скелета индольного коль-

Расчетные значения параметров, характеризующих эффективность безызлучательного переноса энергии от тирозиновых остатков к триптофановому в азурине

Номер тирозинового остатка	$R, \text{ \AA}$	θ	θ_A	θ_D	k^2	W^*
72	17,2	76,6	82,8	142,7	0,28	0,07–0,16
108	11,3	129,8	92,6	136,3	0,54	0,65–0,82

* Приведенные величины W отвечают значениям R_0 13 и 15 \AA .

ца невелика; 3) неясно участие в переносе энергии осциллятора 1L_b триптофанового остатка; 4) при расчете эффективности переноса энергии от тирозиновых остатков к триптофановому не учитывалась внутримолекулярная подвижность триптофанового остатка (см. выше), которая может существенно влиять на величину k^2 (см., например, [22]); 5) нет способа учесть реальное значение показателя преломления (n) среды между донором и акцептором, хотя вероятность переноса зависит от n [24]; 6) неизвестны квантовые выходы флуоресценции остатков тирозина, а следовательно, действительные значения R_0 . По очень грубым оценкам, основанным на данных, приведенных в работе Сабо с соавт. [10], квантовый выход тирозиновых остатков в азурине близок к квантовому выходу свободного тирозина в растворе.

Механизм тушения триптофановой флуоресценции азурина его медьсодержащим центром. Из анализа рентгеноструктурных данных следует, что расстояние между ионом меди и геометрическим центром индольного кольца составляет 11,8 \AA (рис. 1). Лиганды меди также расположены на значительном расстоянии от кольца: атомы серы S_γ Cys¹¹² и S_δ Met¹²¹ — на расстоянии 10,6 и 11,0 \AA ; атомы азота N_6 , His^{46,117} — 11,8 и 13,9 \AA ; геометрические центры колец этих гистидиновых остатков — 12,1 и 15,0 \AA . Очевидно, что представление о непосредственном контакте иона меди или одного из лигандов медьсодержащего центра с индольным кольцом, которое привлекается в работах [4, 7–10] для объяснения шестикратного возрастания тушения триптофановой флуоресценции в холоазурине по сравнению с его апоформой, не согласуется с этими данными. Можно, конечно, предположить, что либо макромолекула азурина в растворе присуща высокочастотная внутримолекулярная подвижность столь большой амплитуды, что она и обеспечивает приводящий к тушению флуоресценции контакт индольного кольца с медьсодержащим центром, либо данные о структуре азурина в кристаллическом состоянии вообще не отражают реальной структуры белка в растворе. Оба эти предположения, на наш взгляд, маловероятны, и необходимо поэтому искать новое объяснение феномену шестикратного возрастания интенсивности флуоресценции азурина при удалении меди.

В ряде работ отмечается небольшое различие спектров поглощения апо- и холоформ азурина в УФ-области, которое их авторы связывают с существованием в этой спектральной области полосы поглощения «голубого» медьсодержащего центра [8, 10]. Следует поэтому рассмотреть в качестве возможного механизма тушащего действия медьсодержащего центра безызлучательный перенос энергии возбуждения от триптофанового остатка к медьсодержащему центру по индуктивно-резонансному механизму. Необходимо, однако, учитывать, что в этом случае интенсивность поглощения, а следовательно, и величина интеграла перекрывания спектров флуоресценции триптофанового остатка (донора) и полосы поглощения акцептора, определяющего вероятность переноса, невелика. Расстояние же между триптофановым остатком и медьсодержащим центром, как отмечалось выше, значительное. Таким образом, если даже медьсодержащий центр действительно имеет полосу поглощения в УФ-области спек-

ра, перекрывающуюся со спектром флуоресценции триптофана, безызлучательный перенос энергии не может объяснить шестикратного тушения триптофановой флуоресценции в холоазурине.

При анализе рентгеноструктурных данных нами было обнаружено, что, несмотря на большое расстояние между медьсодержащим центром и индольным кольцом триптофанового остатка, последнее практически не экранировано от иона меди какими-либо группами белка, т. е. между триптофановым остатком и ионом меди имеется вытянутая полость (рис. 3). Часто отмечают, что β -складчатая структура этого белка образует «бочонок», в центре которого находится триптофановый остаток [2, 10, 12]. Следуя этому образу, можно сказать, что медьсодержащий центр является «крышкой» этого «пустого бочонка». В связи с такой локализацией триптофанового остатка можно предположить, что тушащее действие медьсодержащего центра обусловлено тем, что ион меди, несущий значительный положительный заряд, создает сильное электростатическое поле, которое из-за отсутствия между медьсодержащим центром и индольным кольцом экранирующих групп оказывает на индольное кольцо значительное влияние. Возможно, именно с этим связано также различие спектров поглощения апо- и холоформ белка в УФ-области спектра, отмеченное в работах [8, 10].

В литературе существует представление о том, что при переходе в возбужденное состояние в индольном кольце происходит такое перераспределение заряда, что на одном из атомов локализуется высокая электронная плотность и при определенных условиях возможен отрыв электрона от кольца, что приводит к тушению флуоресценции (см., например, [15]). Можно предположить, что в азурине электрическое поле, создаваемое положительным зарядом, локализованным на атоме меди, вызывает такой отрыв электрона от индольного кольца при его переходе в возбужденное состояние. В литературе имеются примеры переноса электрона на значительные расстояния от электронодонорных к электроакцепторным группам [29]. В случае азурина для объяснения феномена тушения флуоресценции нет необходимости предполагать такой перенос электрона, достаточно допустить лишь очень быстрый отрыв электрона от кольца. Поскольку средние значения времен жизни возбужденного состояния для апо- и холоформ азурина близки [8, 10], необходимо предположить, что константа скорости отрыва электрона от индольного кольца при переходе его в возбужденное состояние очень велика (отрыв происходит практически мгновенно). Восстановление меди незначительно влияет на величину квантового выхода флуоресценции азурина [10]. Вероятно, отрыв электрона от индольного кольца при его переходе в возбужденное состояние происходит и в том случае, когда медь несет единичный положительный заряд.

Применение изложенного на примере азурина метода анализа рентгеноструктурных данных ко всей совокупности белков с известной пространственной структурой, на наш взгляд, даст возможность проверить и уточнить, а в каких-то случаях, возможно, и пересмотреть сложившиеся к настоящему времени представления о взаимосвязи характеристик собственной УФ-флуоресценции белков и свойств микроокружения отдельных триптофановых (тирозиновых и фенилаланиновых) остатков. Такая работа проводится нами в настоящее время.

ЛИТЕРАТУРА

1. Finazzi-Agrò A., Rotilio G., Avigliano L., Guerrieri P., Boffi V., Mondovi B. *Biochemistry*, 1970, v. 9, № 9, p. 2009–2014.
2. Burstein E. A., Permyakov E. A., Yashin V. A., Burkhanov S. A., Finazzi-Agro A. *Biochim. et biophys. acta*, 1977, v. 491, № 1, p. 155–159.
3. Munro I., Pecht I., Stryer L. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1979, v. 76, № 1, p. 56–60.
4. Кузнецова И. М., Туровец К. К. *Молекулярн. биология*, 1983, т. 17, № 4, с. 741–754.
5. Буриштейн Э. А. *Молекулярн. биология*, 1983, т. 17, № 3, с. 455–467.
6. Туровец К. К., Кузнецова И. М. *Молекулярн. биология*, 1982, т. 17, № 3, с. 468–474.

7. *Finazzi-Agro A., Giovagnoli C., Avigliano L., Rotilio G., Mondovi B.* Eur. J. Biochem., 1973, v. 34, № 1, p. 20-24.
8. *Grinvald A., Schlessinger J., Pecht I., Steinberg I.* Z. Biochemistry, 1975, v. 14, № 9, p. 1921-1929.
9. *Mallinson R., Carter R., Ghiron C. A.* Biochem. et biophys. acta, 1981, v. 671, № 2, p. 117-122.
10. *Szabo A. G., Stepanik T. M., Wayner D. M., Young N. M.* Biophys. J., 1983, v. 41, № 3, p. 233-244.
11. *Adman E. T., Jensen L. H.* Isr. J. Chem., 1981, v. 21, № 1, p. 8-12.
12. *Adman E. T., Stenkamp R. E., Steker L. C., Jensen L. H.* J. Mol. Biol., 1978, v. 123, № 1, p. 35-47.
13. *Semisotnov G. V., Zikherman K. Kh., Kasatkin S. B., Plitsyn O. B., Anufrieva E. V.* Biopolymers, 1981, v. 20, № 11, p. 2287-2309.
14. *Полинг Л., Полинг П.* Химия. М.: Мир, 1978.
15. *Бурштейн Э. А.* Итоги науки и техники. Сер. биофиз., 1977, т. 7.
16. *Соловьев М. Д.* Картографические проекции. М.: Геодезиздат, 1946.
17. *Szabo A. G., Rayner D. M.* J. Amer. Chem. Soc., 1980, v. 102, № 2, p. 554-563.
18. *Gudgin E., Lopez-Delgado R., Ware W. R.* J. Phys. Chem., 1983, v. 87, № 9, p. 1559-1565.
19. *Lakowicz J. R., Weber G.* Biochemistry, 1973, v. 12, № 21, p. 4171-4179.
20. *Avigliano L., Finazzi-Agro A., Mondovi B.* FEBS Lett., 1974, v. 38, № 2, p. 205-208.
21. *Förster Th.* Rad. Res., Suppl. 2, 1960, p. 326-339.
22. *Dale R. E., Eisinger J.* Biopolymers, 1974, v. 13, № 7, p. 1573-1605.
23. *Truong T. B., Petit A. J.* Phys. Chem., 1979, v. 83, № 10, p. 1300-1305.
24. *Weber G.* Biochem. J., 1960, v. 75, № 2, p. 335-345.
25. *Yamamoto Y., Tanaka J.* Bull. Chem. Soc. Japan, 1972, v. 45, № 5, p. 1362-1366.
26. *Умецкий В. Н., Туроверов К. К.* Оптика и спектроскопия, 1978, т. 44, № 6, с. 1090-1095.
27. *Yamane T., Andou T., Ashida T.* Acta crystallogr., 1977, v. B33, p. 1650-1653.
28. *Steinberg I.* Ann. Rev. Biochem., 1971, v. 40, p. 83-114.
29. *Miller J. R., Peoples J. A., Schmitt M. J., Closs G. L.* J. Amer. Chem. Soc., 1982, v. 104, № 24, p. 6488-6493.

Поступила в редакцию
25.X.1983
После доработки
2.XII.1983

AZURINE UV-FLUORESCENCE INTERPRETATION ON THE BASIS OF X-RAY DATA

TUROVEROV K. K., KUZNETSOVA I. M., ZAITSEV V. N.*

*Institute of Cytology, Academy of Sciences of the USSR, Leningrad;**
A. V. Shubnikov Institute of Crystallography, Academy of Sciences
of the USSR, Moscow

With the purpose of refining current views on the relationship between intrinsic protein UV-fluorescence and microenvironment of tryptophan, tyrosine (phenylalanine)-residues, a specific type of the Protein Data Bank analysis has been suggested which, in particular, allows switching to tryptophan-centric (tyrosine- or phenylalanine-centric) coordinate systems. The application of such analysis to the *P. aeruginosa* azurine structure made it possible to assess the validity of various explanations for unusual fluorescence properties of this protein which can be found in literature. In its turn, it permitted to discriminate some contradictory conclusions and, moreover, to propose in some cases new interpretation for experimental data.

The tryptophan microenvironment in azurine is built up mainly of nonpolar hydrocarbon chains, no polar side chain being apposed ($r < 7 \text{ \AA}$) to the indole ring. There are several polar atoms in the indole ring vicinity, such as peptide oxygens and nitrogens. However, only the oxygen atom of the tryptophan residue is in direct contact with the ring. Some cavities are discerned around the tryptophan side chain which has unstrained conformation.

These data are analyzed in the light of literature data on the unique short-wave position of azurine fluorescence and on the high-frequency indole ring mobility of considerable amplitude. Examination of the tyrosine-tryptophan distances and orientation provided evidence for a low efficiency of the energy transfer between Tyr⁷² and Trp⁴⁸, contrary to the over 50% efficiency of the Tyr¹⁰⁸→Trp⁴⁸ energy migration. A mechanism for dramatic enhancement of the azurine fluorescence intensity accompanying the copper removal is considered taking into account over a 10 Å remoteness of the «blue» copper center from the indole ring.