



УДК 577.155.2.04

РИБОНУКЛЕАЗА *BACILLUS INTERMEDIUS* 7P.  
ИССЛЕДОВАНИЕ СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ РОЛИ  
ОСТАТКОВ ТРИПТОФАНА  
С ПОМОЩЬЮ ХИМИЧЕСКОЙ МОДИФИКАЦИИ

Голубенко И. А., Лещинская И. В.,

*Казанский государственный университет им. В. И. Ульянова-Ленина, Казань*

Дудкин С. М.

*Институт молекулярной биологии Академии наук СССР, Москва*

Изучена модификация трех остатков триптофана РНКазы *Bacillus intermedius* 7P N-бромсукцинимидом. Показано, что в натрий-ацетатном буфере в диапазоне значений pH 3–5,5 фермент существенно меняет свою конформацию. При pH 3 окислению доступны все три остатка триптофана, при pH 4 доступность модификации у триптофана-34 значительно ниже, чем у триптофана-93, а остаток триптофана-70 практически полностью экранирован. При pH 5,5 окислению подвергается только остаток триптофана-93, не существенный для функциональной активности фермента. Модификация одного из двух «погруженных» триптофанов приводит к инактивации РНКазы. Окисление N-бромсукцинимидом сопровождается частичным расщеплением пептидных связей, однако разрывы не вносят дополнительного вклада в падение ферментативной активности. При pH 3 модификация селективна по остаткам триптофана, а при pH 4 и 5,5 окисляется «высокореакционный» остаток тирозина, ответственный за функциональную активность РНКазы.

РНКазы *Bacillus intermedius* 7P (КФ 3.1.4.23) катализирует расщепление межнуклеотидных связей в молекуле РНК преимущественно после остатков пурриновых нуклеозидов [1].

Этот фермент является удобным объектом для структурно-функциональных исследований ввиду того, что в отличие от большинства пуринспецифических РНКаз он доступен в препаративных количествах, имеет небольшой молекулярный вес ( $M$  12 300) и обладает высокой стабильностью [2]. Недавно была определена первичная структура РНКазы *B. intermedius* 7P [3] и получен ряд ее структурно-функциональных характеристик [4, 5].

Для ряда изученных неспецифических РНКаз установлено участие остатка триптофана в проявлении их каталитической активности [6, 7]. РНКазы *B. intermedius* 7P содержит 3 остатка триптофана [2], в разной степени погруженных в белковую глобулу [5]. Целью нашей работы была их пространственная локализация и изучение функциональной роли. В качестве инструмента исследования мы выбрали N-бромсукцинимид — реагент, широко и успешно использующийся для изучения остатков триптофана в белках [8].

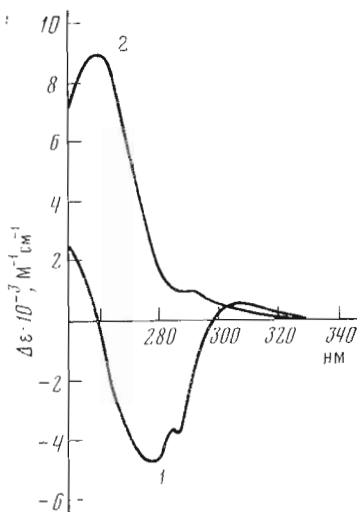


Рис. 1

Рис. 1. Разностные спектры поглощения, возникающие при окислении N-ацетилтриптофиламида (1) и N-ацетилтирозиламида (2) N-бромсукцинимидом; 0,1 М натрий-ацетатный буфер, pH 3-4; 25° С

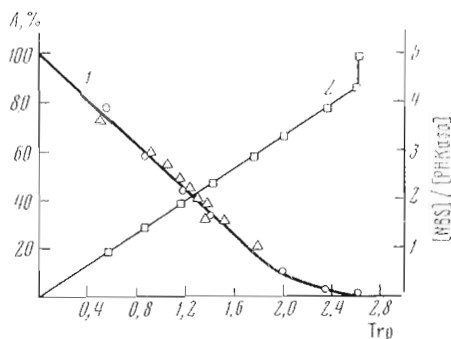


Рис. 2

Рис. 2. Модификация РНКазы *B. intermedius* 7P N-бромсукцинимидом при pH 3 (0,1 М натрий-ацетатный буфер, 25° С): 1 — зависимость активности фермента от степени окисления остатков триптофана. Точками обозначены данные, полученные при прямом спектрофотометрическом титровании, треугольниками — результаты, полученные для модифицированной РНКазы после гель-фильтрации на сефадексе G-75; 2 — зависимость степени модификации от избытка реагента

Степень окисления остатков триптофана РНКазы в присутствии N-бромсукцинимидом измеряли по понижению поглощения белка при 280 нм [8]. Кроме остатков триптофана возможными объектами модификации N-бромсукцинимидом в молекуле могут быть остатки метионина, тирозина и гистидина [8]. РНКазы *B. intermedius* 7P не содержит остатков серосодержащих аминокислот [2], а полосы поглощения гистидина находятся в существенно более коротковолновой области поглощения. Продукт окисления тирозина имеет максимум поглощения при 260 нм, и его появление может лишь незначительно влиять на определение степени модификации остатков триптофана (рис. 1). Для окисления модельных соединений N-ацетилтриптофиламида и N-ацетилтирозиламида потребовалось 1,7 и 3,3 экв. N-бромсукцинимидом, что хорошо соответствует стехиометрии реакций, требующих 1,5 и 3 экв. соответственно [8, 9].

Модификацию РНКазы *B. intermedius* 7P проводили в 0,1 М натрий-ацетатном буфере при pH 3, 4 и 5,5. При pH 3 зависимость между избытком реагента и числом окисленных «эквивалентных» остатков триптофана имеет линейный характер (рис. 2) и для модификации одного остатка требуется 1,7 экв. N-бромсукцинимидом, что указывает на статистический характер модификации и приближение состояния остатков триптофана в молекуле РНКазы к таковому в растворе модельного соединения. Дальнейшее увеличение избытка реагента после модификации 2,6 «эквивалентных» остатков приводило к возрастанию амплитуды спектра поглощения при 280–260 нм и отсутствию изобестической точки при 262 нм — спектральным изменениям, сопровождающим окисление тирозина. Это указывает на существование при pH 3 небольшой фракции молекул с недоступными действию реагента остатками триптофана. Линейная зависимость между уменьшением активности фермента и числом окисленных остатков триптофана наблюдается только при степени модификации, эквивалентной двум модифицированным остаткам, причем она соответству-

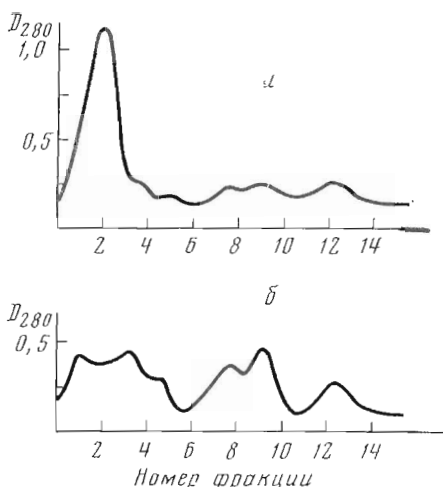


Рис. 3

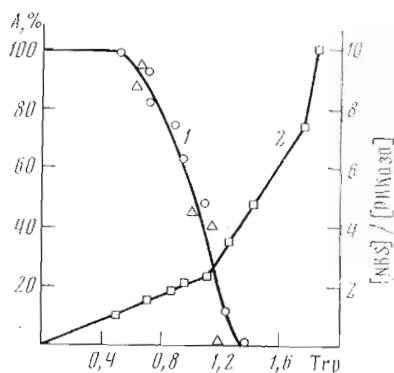


Рис. 4

Рис. 3. Профиль хроматографического разделения препаратов РНКазы *B. intermedius* 7P, модифицированный N-бромсукцинимидом при pH 3 (сверхтонкий сефадекс G-50, 12%  $CH_3COOH$ , колонка  $1 \times 100$  см, объем фракций 1,8 мл, скорость 1,8 мл/ч). *a* — фермент, в котором окислены 1,1 «эквивалентных» остатка триптофана. Фракции 1–5, 9, 10 содержат пептиды с N-концевым Ala, 4, 5, 8, 9 — с N-концевым Val, 8, 12, 13 — с N-концевым Arg, 12, 13 — с N-концевым Leu. *б* — фермент, в котором окислены 2,6 «эквивалентных» остатка триптофана. Фракции 1–3, 9, 10 содержат пептиды с N-концевым Ala, 3–5, 8, 9 — с N-концевым Val, 8, 9, 13 — с N-концевым Arg, 12, 13 — с N-концевым Leu

Рис. 4. Модификация РНКазы *B. intermedius* 7P N-бромсукцинимидом при pH 4 (0,1 M натрий-ацетатный буфер, 25° C): 1 — зависимость активности фермента от степени окисления остатков триптофана. Точками обозначены данные, полученные при прямом спектрофотометрическом титровании, треугольниками — результаты, полученные для высокомолекулярной фракции модифицированной РНКазы; 2 — зависимость степени модификации от избытка реагента

ет 90% инактивации РНКазы (рис. 2). Дальнейшее увеличение избытка N-бромсукцинимидом приводит к нелинейному уменьшению активности, и при степени модификации 2,6 сохраняется меньше 1% активности.

Приведенные данные не позволяют однозначно ответить, сколько остатков триптофана ответственно за функциональную активность фермента, однако из них следует, что существует по крайней мере один остаток, окисление которого приводит к инактивации РНКазы.

Окисление остатков триптофана в молекуле белка может сопровождаться расщеплением соответствующих пептидных связей [9]. Очевидно, что инактивация фермента при модификации N-бромсукцинимидом может быть вызвана не только окислением функционально важного остатка триптофана, но и деструкцией белковой молекулы. Чтобы выяснить причины инактивации РНКазы, фермент при разных степенях модификации хроматографировали на сверхтонком сефадексе G-50, уравновешенном 12% уксусной кислотой. Оказалось, что модификация РНКазы сопровождается расщеплением пептидных связей, причем число фрагментов увеличивается по мере увеличения глубины реакции (рис. 3). Сравнение результатов анализа N-концевых аминокислот, проведенного по всему профилю элюции, с известной первичной структурой РНКазы *B. intermedius* 7P показало, что при pH 3 разрыв полипептидной цепи идет по всем трем остаткам триптофана независимо от степени модификации. Так, при модификации 1,12 «эквивалентных» остатков, как и при максимальном окислении, кроме N-концевого остатка аланина РНКазы определяются только три N-концевые аминокислоты (валин, аргинин, лейцин) пептидов, обра-

**Характеристика препаратов РНКазы *B. intermedius* 7Р,  
модифицированной N-бромсукцинимидом  
(0,1 М ацетат натрия, 25° С)**

рН	Степень модификации	Остаточная активность, %	Число остатков	
			Tyr	His
3	1,1	50	7	1
	1,8	20	6,6	1
4	1,0	45	6,6	1
	1,2	0	5,6	1
Нативная РНКазы	—	100	6,8	1

зованных при расщеплении связей триптофан—валин-35, триптофан—аргинин-71 и триптофан—лейцин-94. Окисления остатков тирозина и гистидина при этом не происходит, на что указывают результаты аминокислотного анализа модифицированной РНКазы (таблица).

Таким образом, из полученных данных следует, что модификация фермента N-бромсукцинимидом сопровождается существенным расщеплением пептидных связей по остаткам триптофана. При этом доля белка с расщепленной полипептидной цепью преобладает. Так, при степени модификации 1,1 фракции, соответствующие по молекулярному весу нативной РНКазе, содержали 27% исходного белка, нанесенного на колонку, а при окислении 2,6 «эквивалентных» остатков триптофана — только 6%. Исследование спектров поглощения этой белковой фракции показало, что она также содержит модифицированные остатки триптофана. Этот факт указывает на то, что модификация N-бромсукцинимидом приводит как к окислению индольного кольца триптофана, так и к последующему частичному расщеплению пептидной связи. Удельная активность фракции нерасщепленного фермента (рис. 3) полностью совпала с удельной активностью соответствующего препарата модифицированной РНКазы до хроматографии. Полученный результат говорит о том, что падение активности при модификации N-бромсукцинимидом, по-видимому, связано с окислением индольного кольца триптофана, а не с разрывом полипептидной цепи.

Чтобы подтвердить этот вывод, мы определили зависимость между степенью модификации и уменьшением ферментативной активности, используя модифицированную РНКазу с нерасщепленной полипептидной цепью. Последнюю получали хроматографией реакционной смеси (рН 3) на колонке со сверхтонким сефадексом G-75 в 12% уксусной кислоте. Колонка была предварительно откалибрована по нативному ферменту и полипептиду 1—93. Полученная таким образом зависимость ферментативной активности от степени модификации практически аналогична таковой для экспериментов, проведенных без хроматографического разделения продуктов реакции (рис. 2). Представленные экспериментальные данные окончательно позволяют заключить, что уменьшение активности РНКазы *B. intermedius* 7Р, происходящее в присутствии N-бромсукцинимида, связано только с окислением остатков триптофана и не вызвано диссоциацией белковой молекулы на фрагменты.

При рН 4 характер зависимости между избытком реагента и числом окисленных остатков триптофана меняется (рис. 4). Модификации подвергаются только два остатка триптофана, причем их доступность модификации различна. Так, если для окисления первого «эквивалентного» остатка требуется 2 экв. N-бромсукцинимида, то модификация второго требует уже более 8 экв. реагента. Иными словами, РНКазы *B. intermedius* 7Р в натрий-ацетатном буфере при изменении рН от 3 к 4 претерпевает конформационный переход, в результате которого, по-видимому, один

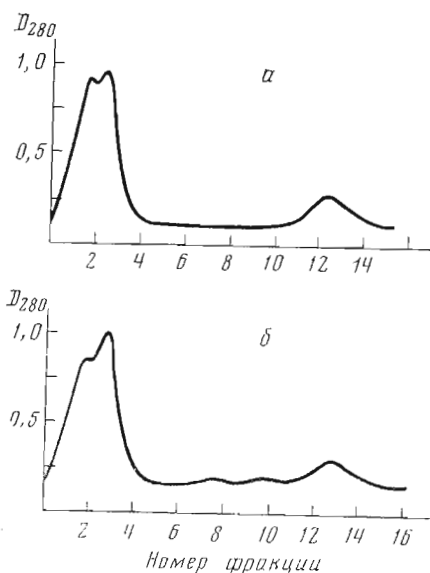


Рис. 5

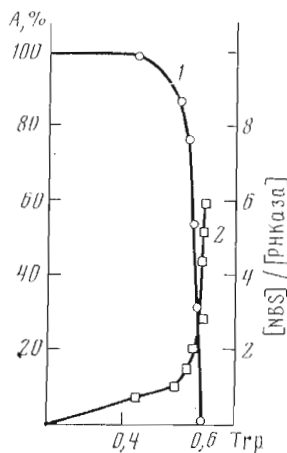


Рис. 6

Рис. 5. Профиль хроматографического разделения (условия — см. подпись к рис. 3) препаратов РНКазы *B. intermedius* 7P, модифицированной N-бромсукцинимидом при pH 4: *a* — фермент, в котором окислен 1 остаток триптофана. Фракции 1–4 содержат пептиды с N-концевым Ala, 12, 13 — N-концевым Leu, *b* — фермент, в котором окислены 1,3 «эквивалентных» остатка триптофана. Фракции 1–5, 10 содержат пептиды с N-концевым Ala, 4, 5, 8 — с N-концевым Val, 12, 13 — с N-концевым Leu

Рис. 6. Модификация РНКазы *B. intermedius* 7P N-бромсукцинимидом при pH 5,5 (0,1 M натрий-ацетатный буфер, 25° C): 1 — зависимость активности фермента от степени окисления остатков триптофана; 2 — зависимость степени модификации от избытка реагента

из остатков триптофана становится полностью недоступным действию N-бромсукцинимиды, а второй существенно погружен в белковую глобулу. Полностью доступен действию модифицирующего агента, вероятно, только один остаток триптофана.

Исследования зависимости активности от числа окисленных остатков триптофана (рис. 4) показали, что на начальной стадии реакция не сопровождается потерей ферментативной активности. Однако после точки, соответствующей модификации 0,5 «эквивалентных» остатков триптофана, дальнейшее увеличение избытка N-бромсукцинимиды сопровождается резким падением ферментативной активности, которая полностью исчезает при окислении 1,3 «эквивалентных» остатков. Изучение препарата модифицированной при pH 4 РНКазы, не содержащего разорванных пептидных связей (получен по аналогии с вышеописанным), свидетельствует о том, что падение активности, как и в предыдущем случае, не связано с диссоциацией деградированной белковой молекулы (рис. 4). Кроме того, определение N-концевых аминокислот пептидов, полученных хроматографией реакционной смеси в 12% уксусной кислоте (см. выше), показали, что наиболее реакционноспособным является остаток триптофана-93 (N-концевой лейцин), а вторым модифицирующимся остатком служит триптофан-34 (N-концевой валин). Окисление остатка триптофана-70 (N-концевой аргинин) проходит лишь в следовых количествах (рис. 5).

Анализ разностных спектров поглощения, возникающих в результате модификации РНКазы N-бромсукцинимидом при pH 4, а также рассмотрение данных, представленных на рис. 4 и 5, позволяют предположить, что наблюдаемая инактивация фермента связана, по крайней мере отчасти, с окислением реакционноспособного остатка тирозина. Это предполо-

жение было подтверждено результатами аминокислотного анализа (таблица), из которого следует, что окисление доступного модификации остатка триптофана сопровождается деструкцией одного остатка тирозина. Разрыва полипептидной цепи при этом, как в случае триптофановых остатков, по-видимому, не происходит, так как соответствующих N-концевых аминокислот в реакционной смеси обнаружено не было.

При pH 5,5 модификации N-бромсукцинимидом доступен только один остаток триптофана, причем его окисление, вероятно, не сопровождается изменением ферментативной активности (рис. 6). Резкая инактивация в пределах увеличения степени модификации от 0,5 до 0,8 связана с потреблением 3,7 экв. N-бромсукцинимидом и может быть отнесена, как и при pH 4, за счет побочной модификации остатка тирозина.

Таким образом, модификация РНКазы *B. intermedius* 7P N-бромсукцинимидом показала, что в натрий-ацетатном буфере фермент в диапазоне значений pH 3—5,5 существенно меняет свою конформацию. При pH 3 окислению доступны все три остатка триптофана, а при pH 4 доступность модификации триптофана-34 значительно ниже, чем у триптофана-93. Остаток триптофана-70 в этих условиях практически полностью экранирован. При pH 5,5 окислению подвергается только один остаток триптофана-93, причем, как и при pH 4, это мало влияет на функциональную активность фермента. Модификация одного из двух «погруженных» триптофанов приводит к инактивации РНКазы. Кроме того, в молекуле фермента существует «высокореакционный» остаток тирозина, также ответственный за его функциональную активность. Интересно, что если при pH 5,5 спектр КД РНКазы (240—320 нм) в натрий-ацетатном буфере полностью аналогичен таковому для фермента в растворе 0,1 М NaCl, то при pH 3 характерное поглощение в этой области (ацетатный буфер) полностью исчезает, хотя в 0,1 М NaCl различия, наблюдаемые для этих значений pH, минимальны. По-видимому, разворачивание белковой молекулы связано со специфическим действием иона ацетата.

Полученные в настоящей работе данные по доступности к модификации остатков триптофана РНКазы *B. intermedius* 7P при pH 5,5 полностью совпадают с результатами спектральных исследований [5]. Кроме того, ранее было показано, что молекула фермента сохраняет экранированным один остаток триптофана даже в 8 М мочеvine и 4 М хлориде гуанидина [5]. Из сопоставления этих фактов с представленными результатами можно сделать вывод, что таким остатком является триптофан-70, которому, по-видимому, принадлежит особая роль в формировании гидрофобного ядра молекулы и ее функционально активной конформации.

### Экспериментальная часть

РНКазу *B. intermedius* 7P получали аналогично описанному ранее [4], N-ацетилтриптофиламид и N-ацетилтирозиламид (Sigma, США) использовали без дополнительной очистки, poly(A) (Reanal, Венгрия) дополнительно очищали на сефадексе G-50 в 0,01 М бикарбонате аммония с последующей лиофилизацией. Концентрацию нативного фермента, производных аминокислот и poly(A) определяли спектрофотометрически, используя для РНКазы  $\epsilon_{280}$  22 500 (pH 4—8) и  $\epsilon_{280}$  20 800 (pH 2—3), N-ацетилтриптофиламида  $\epsilon_{282}$  5500, N-ацетилтирозиламида  $\epsilon_{275}$  1340 [10]. Спектры поглощения и разностные спектры поглощения снимали с помощью спектрофотометра «Cary-118» (Varian, США) при 25° С и размере щели 0,5 мм, используя необходимые диапазоны чувствительности прибора.

Титрование N-бромсукцинимидом модельных соединений проводили в кювете с длиной оптического пути 1 см и объемом 1 или 2 мл. Свежеприготовленный раствор реагента в воде с исходной концентрацией 0,01—0,04 М добавляли порциями по 1—5 мкл с помощью микрошприца фирмы

«Hamilton» (США) к фиксированному объему модельного соединения с концентрацией 0,15—0,25 мМ. Для определения количества окисленного N-ацетилтриптофиламида и N-ацетилтирозиламида использовали разностные коэффициенты молярной экстинкции  $\Delta\epsilon_{280}$  4700 и  $\Delta\epsilon_{260}$  8900  $M^{-1} cm^{-1}$  соответственно.

Модификацию РНКазы N-бромсукцинимидом проводили при 25° С в кювете с длиной оптического пути 1 см, содержащей раствор фермента в концентрации 20—40 мкМ. Записывали нулевую линию и спектр поглощения немодифицированного белка, а затем микрошприцем при быстром перемешивании добавляли порциями по 1—2 мкл раствор реагента с исходной концентрацией 0,01—0,02 М. После прекращения изменений в поглощении при 280 нм (обычно через 1—2 мин) снимали спектр поглощения и разностный спектр поглощения против раствора нативного белка, после чего отбирали аликвоту для определения ферментативной активности. При модификации образцов, предназначенных для колоночной хроматографии, концентрация РНКазы в реакционной смеси была 0,2—0,3 мМ. Степень модификации остатков триптофана в белке определяли по общепринятому уравнению [8]:

$$n = \Delta D_{280} \cdot 1,13 / 5500 [E],$$

где  $\Delta D_{280}$  — уменьшение поглощения при 280 нм, 1,31 — эмпирический коэффициент, 5500 — коэффициент молярной экстинкции триптофана, [E] — концентрация белка. Степень модификации в РНКазе, полученной после хроматографии на сефадексе G-75, определяли, используя соотношение

$$n = 4,95 - 3,55 D_{280} / D_{262},$$

где  $D_{262}$  — поглощение, соответствующее изобестической точке на спектрах поглощения модифицированной РНКазы, имеющей  $\epsilon_{262}$  14 900  $M^{-1} cm^{-1}$ , а 4,95 и 3,55 — эмпирические коэффициенты.

Определение активности нативной и модифицированной РНКазы проводили при 25° С по начальной скорости расщепления poly(A) аналогично описанному ранее [2]. Активность выражали как изменение поглощения при 283 нм за 1 мин, отнесенное к концентрации фермента в кювете.

Анализ N-концевых аминокислот проводили методом дансильирования аналогично работе [11]. Хроматографию проводили в двух взаимно перпендикулярных направлениях в системах вода — муравьиная кислота — пропанол (100 : 2 : 5) и бензол — уксусная кислота — бутанол (90 : 10 : 5) на полиамидных пластинках (5×7 см) фирмы VDH (Англия). Для разделения Dns-производных аргинина и N<sup>ε</sup>-Dns-лизина использовали систему шприцы — аммиак — вода (2 : 1 : 10) [12].

Аминокислотный анализ проводили после гидролиза белка 5,7 н. HCl (трижды перегнанной над SnCl<sub>2</sub>) при 105° С в течение 24 ч с помощью аминокислотного анализатора «Durrum D-500» (США). Содержание аминокислот в модифицированных препаратах РНКазы определяли после двух независимых анализов. В качестве контроля проводили четыре независимых анализа нативного фермента. Относительное число аминокислотных остатков на молекулу вычисляли, принимая количество аланина и лизина за теоретическое.

Авторы выражают благодарность М. Я. Карпейскому (ИМБ АН СССР) за предоставленную возможность выполнения данной работы в руководимой им лаборатории, постоянное внимание к ней и ценные критические замечания, Г. И. Клейнеру (Рижский завод медпрепаратов при Институте органического синтеза АН ЛатвССР) за предоставление ферментного препарата и Г. А. Афанасенко (ИМБ АН СССР) за помощь в работе.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Булгакова Р. М., Лецинская И. Б., Балабан Н. П., Егорова Г. С. Основные биохимические свойства высокоочищенной экстрацеллюлярной РНКазы *Bac. intermedius*.— Биохимия, 1974, т. 39, вып. 2, с. 299–302.
2. Голубенко И. А., Балабан Н. П., Лецинская И. Б., Волкова Т. И., Клейнер Г. И., Чепурнова Н. К., Афанасенко Г. А., Дудкин С. М. Рибонуклеаза *Bacillus intermedius* 7P. Очистка хроматографией на фосфоцеллюлозе и некоторые характеристики гомогенного фермента.— Биохимия, 1979, т. 44, вып. 4, с. 640–648.
3. Афанасенко Г. А., Дудкин С. М., Каминир Л. В., Голубенко И. А., Северин Е. С. Первичная структура рибонуклеазы *Bacillus intermedius* 7P.— Биоорг. химия, 1979, т. 5, № 2, с. 187–202.
4. Болотина И. А., Дудкин С. М., Лузаускас В. Ю., Ханданян А. Ж., Лецинская И. Б. Рибонуклеаза *Bacillus intermedius* 7P. Определение вторичной структуры в растворе методом КД.— Биоорг. химия, 1979, т. 5, № 2, с. 203–209.
5. Ханданян А. Ж., Дудкин С. М. Рибонуклеаза *Bacillus intermedius* 7P. Исследование состояния остатков тирозина и триптофана с помощью разностных спектров поглощения.— Биоорг. химия, 1979, т. 5, № 11, с. 1700–1709.
6. Irie M., Harada M., Sawada F. Studies on the state of tryptophan residues in ribonuclease from *Aspergillus saitoi*.— J. Biochem., 1972, v. 72, № 6, p. 1351–1359.
7. Sanda A., Irie M. Chemical modification of tryptophan residues in ribonuclease from *Rhizopus sp.*— J. Biochem., 1980, v. 87, № 4, p. 1079–1087.
8. Spande T., Witkop B. Determination of the tryptophan content of protein with N-bromosuccinimide.— In: Methods in Enzymology. New York: Acad. Press Inc., 1967, v. 11, p. 498–532.
9. Spande T., Witkop B., Degani Y., Patchornic A. Selective cleavage and modification of peptides and proteins.— In: Advances in protein chemistry. New York – London: Acad. Press, 1970, v. 24, p. 98–260.
10. Wetlaufer D. B. Ultraviolet spectra of proteins and amino acids.— In: Advances in protein chemistry. New York – London: Acad. Press, 1962, v. 17, p. 303–390.
11. Афанасенко Г. А., Нисанов В. Я., Шляпников С. В., Каминир Л. В., Северин Е. С. Количественный дансильный микрометод анализа аминокислот. Исследование пептидных карт триптического гидролизата рибонуклеазы.— Биохимия, 1977, т. 42, вып. 12, с. 2178–2185.
12. Мясников А. Н., Мязкова М. А., Шляпников С. В., Орлов В. М., Торчинский Ю. М., Северин Е. С. Первичная структура цитоплазматической аспартат-аминотрансферазы из сердца кур. I. Характеристика белка и структура пептидов триптического гидролизата цитраконилированной аспартат-аминотрансферазы.— Биоорг. химия, 1980, т. 6, № 3, с. 348–358.

Поступила в редакцию  
30.XII.1980

### RIBONUCLEASE *BACILLUS INTERMEDIUS* 7P. CHEMICAL MODIFICATION STUDY OF FUNCTIONAL SIGNIFICANCE OF TRYPTOPHAN RESIDUES

GOLUBENKO I. A., LESHCHINSKAYA I. B., DUDKIN S. M.

*V. I. Ulyanov-Lenin State University, Kazan, Institute of Molecular  
Biology, Academy of Sciences of the USSR, Moscow*

At pH 3 all three tryptophan residues of *Bacillus intermedius* 7P RNase (Trp-34, 70 and 93) react with N-bromosuccinimide, whereas at pH 4 Trp-93 is more susceptible to oxidation than Trp-34, and Trp-70 is inaccessible. A conformational change of the RNase occurs in the pH range 3-5.5. At pH 5.5 only functionally non-essential Trp-93 can be oxidized. Modification of one of two buried tryptophans leads to RNase inactivation. N-Bromosuccinimide also causes partial cleavage of the peptide bonds, this effect, however, does not further impair the enzymatic activity. At pH 3 only tryptophan residues are selectively modified, whereas at pH 4 or 5.5 a highly reactive tyrosine residue, essential for enzymatic activity, is subject to oxidation.