



УДК 577.152.277/136

ТОПОХИМИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ СУБСТРАТНОЙ СПЕЦИФИЧНОСТИ
РИБОНУКЛЕАЗЫ
*PENICILLIUM BREVICOMPACTUM*Яковлев Г. И., Моисеев Г. П., Бочаров А. Л.,
Михайлов С. Н., Карпейский М. Я.

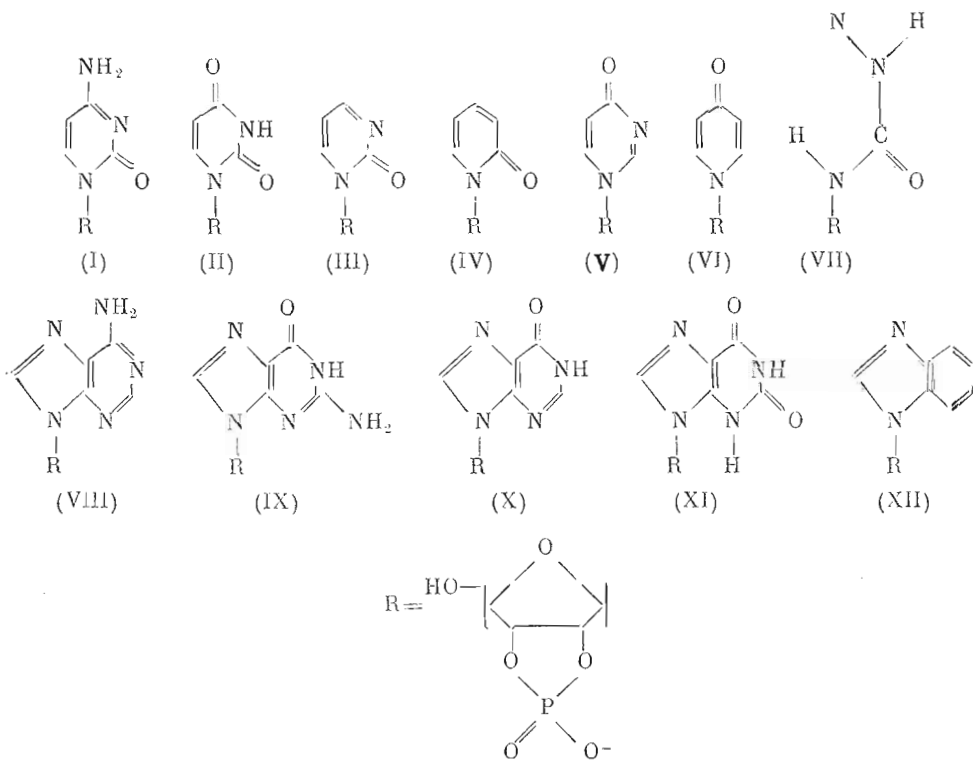
Институт молекулярной биологии Академии наук СССР, Москва

Измерены кинетические параметры гидролиза мононуклеозид-2',3'-циклофосфатов с пиримидиновыми и пуриновыми основаниями и их аналогами РНКазой *P. brevicomcompactum*. Обнаружено, что в логарифмическом масштабе наблюдаемые константы скоростей и константы Михаэлиса связаны линейными отношениями. Эти взаимоотношения кинетических параметров гидролиза рассмотрены в рамках двухстадийной модели реакции. Выявлено различие каталитических констант скоростей для пиримидин- и пуринсодержащих субстратов, что, по-видимому, связано с различной структурой их фермент-субстратных комплексов. Рассмотрена природа взаимодействий гетероциклических оснований субстратов с молекулой белка.

Исследование механизма гидролиза нуклеозид-2',3'-циклофосфатов различными пиримидинспецифичными и гуанилспецифичными рибонуклеазами показало, что субстраты дискриминируются по их способности образовывать определенные водородные связи между гетероатомами оснований нуклеотидов и молекулой белка [1—9]. Изучение РНКаз, не проявляющих специфичности к природе гетероциклических оснований субстратов, до последнего времени ограничивалось РНКазой T_2 из гриба *Aspergillus oryzae* [10, 11]. Было показано, что субстратами этого фермента среди 2',3'-циклофосфатов являются нуклеозиды — производные пентофураноз. β -D-рибо- либо α -L-ликсо-ряда, тогда как соответствующие эфиры β -L-рибо- и α -D-рибо-рядов не гидролизуются. Замена основания β -D-нуклеозиды метильной группой делает соответствующий аналог субстрата устойчивым к действию фермента. Очевидно, что гетероциклическое основание нуклеозиды является необходимым фрагментом молекулы субстрата, узнаваемым РНКазой T_2 . На основании полуколичественного изучения скоростей гидролиза ряда аналогов субстратов было сделано заключение, что взаимодействие между основаниями субстратов и молекулой белка при образовании фермент-субстратных комплексов носит преимущественно гидрофобный характер [11].

Данная работа — очередной этап систематического изучения механизма действия неспецифичной к основаниям субстратов РНКазы из гриба *Penicillium brevicomcompactum* (КФ 3.1.4.23). Ранее нами были определены ионогенные группы этого фермента, участвующие в реакции трансэтерификации и гидролиза нуклеозидциклофосфатов, и показано, что одни и те же группы участвуют в катализе при действии фермента на пиримидин- и пуринсодержащие субстраты [12]. Целью настоящего исследования было изучение характера взаимодействия фермента с нуклеозидным (не трансформируемым) фрагментом субстрата — нуклеозид-2',3'-циклофосфата, поскольку именно это взаимодействие проявляется в субстратной специфичности фермента.

Для решения поставленной задачи были проведены измерения кинетических параметров гидролиза мононуклеозидциклофосфатов пуринового и пиримидинового ряда и их аналогов. В качестве аналогов использовались соединения, у которых по сравнению с природными селективно элиминированы некоторые гетероатомы основания (соед. (I) — (XII)), что позволило широко варьировать средство соответствующих субстратов к ферменту (табл. 1).



Из рисунка видно, что в логарифмическом масштабе константы скорости гидролиза нуклеозидциклофосфатов и константы Михаэлиса в пиримидиновой и пуриновой серии субстратов связаны линейными соотношениями. Анализ этих зависимостей показал, что они описываются следующими уравнениями:

а) для субстратов пиримидинового ряда:

$$\ln k_{\text{кат}}^{\text{набл}} = -4,78 - 1,14 \ln K_m^{\text{набл}} \quad (1)$$

или

$$k_{\text{кат}}^{\text{набл}} = 8,4 \cdot 10^{-3} \exp\left(-1,14 \frac{\Delta G^{\text{набл}}}{RT}\right), \quad (2)$$

б) для субстратов пуринового ряда:

$$\ln k_{\text{кат}}^{\text{набл}} = -10,18 - 1,56 \ln K_m^{\text{набл}} \quad (3)$$

или

$$k_{\text{кат}}^{\text{набл}} = 3,8 \cdot 10^{-5} \exp\left(-1,56 \frac{\Delta G^{\text{набл}}}{RT}\right), \quad (4)$$

Зависимость $\ln k_{\text{кат}}^{\text{набл}}$ от $\ln K_m^{\text{набл}}$ в реакции гидролиза нуклеозид-2',3'-циклофосфатов РНКазой *P. brevicompactum*. Цифры около экспериментальных точек означают тип нуклеотида в соответствии со структурами, приведенными на схеме

где $k_{\text{кат}}^{\text{набл}}$ — наблюдаемая константа скорости гидролиза в с^{-1} , $K_m^{\text{набл}}$ — наблюдаемая константа Михаэлиса в М, $\Delta G = RT \ln K_m^{\text{набл}}$.

Таким образом, специфичность РНКазы *P. brevicompactum* проявля-

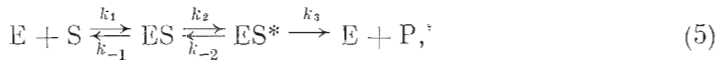
Кинетические параметры гидролиза нуклеозид-2',3'-циклофосфатов РНКазой
*P. brevicompactum**
 рН 5,7, I=0,2 (NaCl), 25° С

Субстрат	$k_{\text{кат}}^{\text{набл}}, \text{с}^{-1}$	$K_{\text{м}}^{\text{набл}} \cdot 10^3, \text{М}$	$\frac{k_{\text{кат}}^{\text{набл}}}{K_{\text{м}}^{\text{набл}}}, \text{М}^{-1} \text{с}^{-1}$	$-\Delta G_{\text{набл}}, \text{ккал/моль}$	$-\Delta G^*, \text{ккал/моль}$
Cyd-2',3'-P (I)	64	3,59	$1,78 \cdot 10^5$	4,68	10,02
Urd-2',3'-P (II)	64	3,51	$1,83 \cdot 10^5$	4,69	10,04
2 Ох Pyr-Rib-2',3'-P (III)	18,6	5,26	$3,53 \cdot 10^4$	4,45	9,52
2 Ох Py-Rib-2',3'-P (IV)	7,8	80	$9,74 \cdot 10^2$	2,85	6,10
4 Ох Pyr-Rib-2',3'-P (V)	0,33	333	10	2,01	4,3
4 Ох Py-Rib-2',3'-P (VI)	0,66	370	17,8	1,95	4,17
NH ₂ CONH-Rib-2',3'-P (VII)	0,1	1000	1	1,36	2,91
Ado-2',3'-P (VIII)	43	1,28	$3,36 \cdot 10^5$	5,29	13,54
Guo-2',3'-P (IX)	10	3,45	$2,9 \cdot 10^4$	4,7	12,03
Ino-2',3'-P (X)	3,3	8	$4,1 \cdot 10^3$	4,21	10,77
Xan-2',3'-P (XI)	0,23	37	62	3,3	8,49
BI-Rib-2',3'-P (XII)	0,04	95	4,2	2,75	7,04

* Нестандартные сокращения: 2 Ох Pyr — 1,2-дигидропиримидин-2-он, 4 Ох Pyr — 1,4-дигидропиримидин-4-он, 2 Ох Py — 1,2-дигидропиридин-2-он, 4 Ох Py — 1,4-дигидропиридин-4-он, BI — бензоимидазол.

ется как в $k_{\text{кат}}^{\text{набл}}$, так и в $K_{\text{м}}^{\text{набл}}$ (табл. 1), причем соблюдается принцип «лучшее связывание — лучший катализ» [13].

Для интерпретации эмпирических параметров уравнений (2) и (4) рассмотрим взаимосвязь $k_{\text{кат}}^{\text{набл}}$ и $K_{\text{м}}^{\text{набл}}$ в рамках двухстадийной схемы реакции:



где ES и ES* — первый (неактивный) и второй (активный) фермент-субстратные комплексы.

Для двухстадийной реакции наблюдаемые значения $k_{\text{кат}}^{\text{набл}}$ и $K_{\text{м}}^{\text{набл}}$ даются выражениями

$$k_{\text{кат}}^{\text{набл}} = \frac{k_3}{1 + \frac{k_{-2} + k_3}{k_2}}, \quad (6)$$

$$K_{\text{м}}^{\text{набл}} = \frac{k_{-1}}{k_1} \cdot \frac{\frac{k_3}{k_{-1}} + \frac{k_{-2} + k_3}{k_2}}{1 + \frac{k_{-2} + k_3}{k_2}}. \quad (7)$$

В соответствии с представлениями, развитыми в работах [14, 15], изменения в широком диапазоне $k_{\text{кат}}^{\text{набл}}$ в ряду субстратов, различающихся по структуре не трансформируемой в реакции части молекулы, могут наблюдаться при постоянной величине k_3 за счет изменения величины $K_p = [ES^*]/[ES]$ при $K_p \ll 1$, т. е. когда образование комплекса ES* является лимитирующей скоростью стадией реакции. В этом случае (при $k_{-2} \gg k_3$ и $k_2 < k_{-1}$) выражения (6) и (7) преобразуются к виду

$$k_{\text{кат}}^{\text{набл}} = k_3 \frac{K_p}{1 + K_p}, \quad (8)$$

$$K_{\text{м}}^{\text{набл}} = \frac{K_S}{1 + K_p}, \quad (9)$$

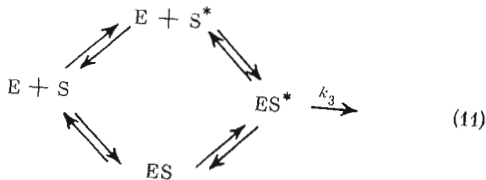
где $K_S = k_{-1}/k_1$.

Из соотношений (8) и (9) следует, что $k_{\text{кат}}^{\text{набл}}$ и $K_{\text{м}}^{\text{набл}}$ связаны уравне-

нием

$$k_{\text{кат}}^{\text{набл}} = k_3 \cdot \frac{K_P}{K_S} \cdot K_m^{\text{набл}}. \quad (10)$$

Преобразуем уравнение (9) к виду эмпирических уравнений (2) и (4). Учитывая альтернативный путь образования комплекса ES^* непосредственно из соответствующей формы субстрата и фермента, схему (5) можно представить в виде



Выражая K_P через остальные константы равновесий схемы (11), получаем

$$K_P = K^* \cdot \frac{K_S}{K_S^*}, \quad (12)$$

где

$$K_S^* = \frac{[S^*][E]}{[ES^*]} \quad \text{и} \quad K^* = \frac{[S^*]}{[S] - [S^*]}.$$

Тогда

$$k_{\text{кат}}^{\text{набл}} = k_3 \cdot K^* \cdot \frac{K_m^{\text{набл}}}{K_S^*}. \quad (13)$$

Отсюда

$$k_{\text{кат}}^{\text{набл}} = k_3 \cdot K^* \exp\left(-\frac{\Delta G^*}{RT} + \frac{\Delta G^{\text{набл}}}{RT}\right) \quad (14)$$

или

$$k_{\text{кат}}^{\text{набл}} = k_3 \cdot K^* \exp\left(-\xi \frac{\Delta G^{\text{набл}}}{RT}\right), \quad (15)$$

где

$$\xi = \frac{\Delta G^*}{\Delta G^{\text{набл}}} - 1, \quad \Delta G^* = RT \ln K_S^*.$$

Если в ряду субстратов, различающихся нетрансформируемым фрагментом структуры, изменяется величина $K_m^{\text{набл}}$, как, например, в данной работе при изменении гетероциклического основания нуклеотидов, то линейная зависимость $\ln k_{\text{кат}}^{\text{набл}}$ от $\ln K_m^{\text{набл}}$ будет реализоваться только при постоянной величине ξ . В таком ряду субстратов должно соблюдаться соотношение $\Delta G^* = \Delta G^{\text{набл}} \cdot (1 + \xi)$. Из экспериментальных результатов данной работы можно найти, что $\Delta G^{\text{набл}} \approx 0,47 \Delta G^*$ для пиримидинов и $\Delta G^{\text{набл}} \approx 0,39 \Delta G^*$ для пуринов, т.е. наблюдаемая энергия фермент-субстратного взаимодействия составляет соответственно ~ 47 и $\sim 39\%$ величины свободной энергии взаимодействия S^* и E .

Очевидный интерес вызывает обсуждение вопроса о том, что представляет собой комплекс ES^* . Константа диссоциации комплекса ES^* для каждого субстрата существенно ниже, чем соответствующее значение для ES . Так, для Urd- и Cud-2',3'-P различие констант диссоциации ES^* и ES составляет $\sim 10^4$, а для Ado-2',3'-P — 10^6 раз (табл. 1). Тем не менее $[ES] \gg [ES^*]$, так как $K^* \ll 1$.

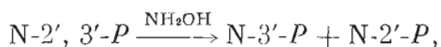
Многочисленные исследования механизмов реакций фосфорных эфиров привели к заключению, что реакция нуклеофильного замещения протекает через стадию образования соединения с пентакоординированным

атомом фосфора [16–18]. В случае гидролиза нуклеозид-2',3'-циклофосфатов таким промежуточным соединением является соответствующий 2',3'-оксифосфоран. Убедительное доказательство образования оксифосфоранового промежуточного соединения было недавно получено в работе [19], где наблюдался обмен фосфорильного кислорода дифенилметилфосфоната с $H_2^{18}O$ со скоростью, составляющей ~8% скорости гидролиза.

Реализация стадии образования соединения с пентакоординированным атомом фосфора в механизме действия циклизующих РНКаз подтверждается обращением конфигурации лигандов атома фосфора на трансферазном и гидролазном этапах реакции расщепления межнуклеотидной связи [20–22]. Образование оксифосфорана характеризуется значительным возрастанием энергии системы [23–24]. Вместе с тем указанное промежуточное соединение, по-видимому, имеет существенно большее сродство к активному центру РНКаз, чем субстрат. Так, в случае РНКазы А константы связывания аналогов оксифосфорана, представленные комплексами уридина с ионами ванадия, были в 10^3 раз больше, чем соответствующая величина для Urd-2'3'-P [25].

Вышеизложенное позволяет предположить, что комплекс ES^* является комплексом фермента и нуклеозид-2',3'-оксифосфорана. В этом случае k_3 является константой скорости ферментативной трансформации этого промежуточного соединения в нуклеозид-3'-фосфат.

Сопоставляя уравнение (15) с эмпирическими зависимостями (2) и (4), можно видеть, что величина $k_3 \cdot K^*$ для пиримидинсодержащих субстратов в ~220 раз больше, чем для пуринсодержащих. Возникает вопрос: чем обусловлено это различие для двух типов циклофосфатов? Чтобы ответить на этот вопрос, необходимо иметь сравнительные данные о реакционной способности этих соединений в бесферментной системе. В работе [26] было показано, что скорости гидролиза Urd-2',3'-P и Cyd-2',3'-P ионами водорода и гидроксила превышают соответствующее значение для Ado-2',3'-P, но не более чем в 3–4 раза. Однако измеренные в работе [26] значения констант скоростей гидролиза циклофосфатов ионами воды могли в существенной мере определяться состоянием ионизации гетероциклических оснований, которые различаются для указанных нуклеотидов при значениях pH, где проводились измерения. Поэтому мы считали целесообразным для сопоставления реакционной способности циклофосфатов, содержащих пуриновые и пиримидиновые основания, определить константы скорости неферментативного гидролиза при нейтральных значениях pH, где основания не ионизованы. Измерения констант скоростей были проверены для реакции гидролиза Cyd-2',3'-P и Ado-2',3'-P под действием гидроксиламина при pH 8. Реакция протекала по схеме



где N — аденозин или цитидин. Регистрация продуктов проводилась методами 1H - и ^{31}P -ЯМР. Соотношение образующихся 3'- и 2'-фосфатов было ~2 : 1. Значения констант скорости гидролиза Cyd-2',3'-P и Ado-2',3'-P при 25° С были найдены равными $(1,1 \pm 0,1) \cdot 10^{-6}$ и $(3,7 \pm 0,9) \cdot 10^{-6} M^{-1}c^{-1}$ соответственно. Таким образом, в неферментативной реакции гидролиза нуклеозидциклофосфатов константы скорости практически не зависят от природы нуклеозида.

Полученные результаты позволяют заключить, что различие параметра $k_3 \cdot K^*$ в уравнении (15) для двух серий субстратов обусловлено изменением величины k_3 , т. е. структура ES^* комплексов фермента с пиримидин- и пуринсодержащими субстратами не идентична. С целью выяснения природы этих различий представляло интерес определить, где связываются нуклеозидные фрагменты пиримидин- и пуринсодержащих субстратов — в одном и том же или в разных участках активного центра? Для этого было проведено изучение ингибирования аденозином и цитидином реакций гидролиза аденозин- и цитидин-2',3'-циклофосфатов. Было обнаружено, что ингибирование гидролиза обоих циклофосфатов нуклеозидами носит конкурентный характер, а величина констант ингибирования аде-

нозином и цитидином не изменяется от того, используется ли в качестве субстрата пурин- или пиримидинсодержащий субстрат (табл. 2). Этот результат вместе с ранее сделанным заключением об участии одних и тех же каталитических групп фермента в гидролизе пиримидин- и пуринсодержащих субстратов [12] позволяет считать, что гетероциклические основания субстратов локализируются в одном и том же участке активного центра фермента.

Таблица 2

Константы ингибирования нуклеозидами реакции гидролиза циклофосфатов РНКазой *P. brevicompactum*

Ингибитор	Субстрат	$K_i \cdot 10^4$, М	Ингибитор	Субстрат	$K_i \cdot 10^4$, М
Cyd	Cyd-2',3'-P	9,8	Ado	Cyd-2',3'-P	11,1
	Ado-2',3'-P	9,9		Ado-2',3'-P	9,6

Обращает на себя внимание близость величин констант ингибирования реакции гидролиза циклофосфатов аденозином и цитидином и те различия в $K_m^{\text{набл}}$, которые наблюдаются для соответствующих циклофосфатов (табл. 1 и 2). Можно полагать, что различие в величинах $K_m^{\text{набл}}$ для Cyd-2',3'-P и Ado-2',3'-P обусловлено различным взаиморасположением фосфодиэфирных групп субстрата и взаимодействующих с ними групп белка. Это предположение подтверждается рассмотрением констант диссоциации комплексов фермента с Cyd-3'-P и Ado-3'-P. При взаимодействии Cyd-3'-P и Ado-3'-P с РНКазой *P. brevicompactum* образуются комплексы, характеризующиеся стехиометрическим отношением 1:1 и константами диссоциации $(1,90 \pm 0,12) \cdot 10^{-5}$ и $(8,50 \pm 0,69) \cdot 10^{-6}$ М соответственно.

Для выяснения характера взаимодействия гетероциклических оснований нуклеозид-2',3'-циклофосфатов с белком рассмотрим изменения свободной энергии при комплексообразовании фермента с субстратами. Этот анализ целесообразно провести, рассматривая вычисленные значения изменений свободной энергии ΔG^* при образовании комплексов ES^* из соответствующей формы субстрата и фермента, так как в комплексах ES^* взаимодействия между субстратом и ферментом реализуются в максимальной возможной мере. Из табл. 1 видно, что наибольшие изменения ΔG^* в ряду пиримидинсодержащих субстратов наблюдаются при элиминировании атома кислорода 2-кетогруппы или N3-атома основания. Так, различие в ΔG^* для субстратов, содержащих урацил и 4-пиримидон, составляет 5,8 ккал/моль, а для субстратов, содержащих 2-пиримидон и 2-пиридон, — 3,4 ккал/моль. Наиболее вероятно, что между указанными гетероатомами пиримидинового основания субстрата и молекулой белка образуются водородные связи в фермент-субстратных комплексах. Следует ожидать, что такие же связи образуются между белком и атомами азота и кислорода остатка мочевины для содержащего ее субстрата. Однако изменение свободной энергии при комплексообразовании $\text{NH}_2\text{CONH-Rib-2',3'-P}$ с РНКазой существенно меньше, чем для субстратов, содержащих «амидный фрагмент» в кольцевой структуре. По-видимому, затраты энергии на дегидратацию и замораживание вращения вокруг C—N-связей при взаимодействии этого субстрата с белком приводят к значительному уменьшению энергии связывания по сравнению, например, с 2-пиримидонрибозид-2',3'-циклофосфатом.

Элиминирование экзоциклической группы в 4-м положении пиримидиновых оснований незначительно влияет на величину ΔG^* (0,5 ккал/моль). Поэтому можно считать, что связывание нуклеозидного фрагмента 4-пиримидонрибозид-2',3'-фосфата с белком в основном обусловлено гидрофобным взаимодействием основания. Энергия этого взаимодействия не может превышать 4,2 ккал/моль (табл. 1).

Изменения в ряду пуриносодержащих субстратов наиболее значительны при протонировании атома N3 или замене его атомом углерода. Поэтому возможно, что атом N3 пуринового основания образует водородную связь с белком, выступая в качестве акцентора протона. Изостерическое по отношению к фосфорибозильному остатку расположение атома N3 пуринов и атома кислорода 2-кетогруппы пиримидинов позволяет считать, что они взаимодействуют с одной и той же протонодонорной группой белка в соответствующих фермент-субстратных комплексах, как это предполагалось ранее одним из нас [27]. Вклад энергии гидрофобного взаимодействия основания субстрата с ферментом в ΔG^* в пуриновом ряду заметно превышает таковой для пиримидинового ряда, как это можно заключить из сопоставления величин ΔG^* для бензоимидазолрибозид- и 4-пиримидофосфата.

Таким образом, взаимодействие оснований субстратов с РНКазой *P. brevicompactum* в фермент-субстратных комплексах может осуществляться как за счет образования водородных связей, так и благодаря гидрофобным взаимодействиям. При этом для природных нуклеозидов определяющее значение имеет образование водородных связей. Весьма вероятно, что основание субстратов фиксируется в активном центре РНКазы *P. brevicompactum* подобно тому, как это наблюдалось для комплекса G_{100} -2'-P с гуанилсцифичной РНКазой T₁ [8]: основание находится между двумя ароматическими остатками и одновременно образует водородные связи с полярными группами других остатков или основной полипептидной цепи.

Экспериментальная часть

Гомогенный препарат РНКазы *P. brevicompactum* готовили путем дополнительной очистки хроматографией по методу [28] препаратов фермента, полученных путем крупномасштабного выделения из гриба в Институте биохимии и физиологии микроорганизмов АН СССР [29]. Циклофосфаты с природными основаниями получали циклизацией смеси 2'- и 3'-фосфатов N,N'-дидецилгексилкарбодиимидом по методу, описанному в работе [30]. Получение и фосфорилирование пиримидиновых нуклеозидов с модифицированными основаниями описано нами ранее [9]. 1- β -D-рибофуранозилбензоимидазол синтезирован по методу [31] и фосфорилирован согласно [9].

Скорость ферментативного гидролиза циклофосфатов измеряли по скоростям появления кислоты, вызванной образованием 3'-фосфатов и вторичной ионизацией их фосфатных групп при pH 5,7 и 0,2 M NaCl методом pH-статирования. Использовался pH-стат фирмы Radiometer. pH-Титрование осуществлялось подачей в кювету $5,6 \cdot 10^{-4}$ M раствора КОН автоматической бюреткой АБУ-12. Кюветы термостатировали при 25° С. Перемешивание раствора в кювете осуществляли в течение всего эксперимента магнитной мешалкой. Объем реакционной смеси составлял 2,05—2,10 мл. Объем раствора КОН, добавляемый для pH-статирования, не превышал 0,2 мл. Для определения концентрации субстратов использовали молярные коэффициенты экстинкции, приведенные в работах [9, 31, 32]. Для вторичной ионизации 3'-фосфатов рК принимали равным 5,9. Неточность рК $\sim 0,2$ приводила к ошибке рассчитанных значений $k_{кат}^{набл} \sim 7\%$.

Измерения констант скоростей гидролиза нуклеозид-2',3'-циклофосфатов гидроксиламина проводили с использованием метода ¹H-ЯМР. При идентификации продуктов использовали ³¹P-ЯМР. Спектры регистрировали на спектрометре Varian-100-15 (США). В условиях измерений начальная концентрация нуклеотида составляла $\sim 10^{-2}$ M, концентрация гидроксиламина варьировала от 0,178 до 0,712 M. Ход реакции контролировали в течение 3 сут. Продуктами реакции были соответствующие 2'- и 3'-мононуклеозидфосфаты. Реакция гидроксиламина с цитозиновым и адениновым основаниями циклофосфатов протекала существенно медленнее, чем изучаемый гидролиз циклофосфатов. В случае Urd-2',3'-P скорость реакции с основанием была настолько большой, что измерить константу

скорости гидролиза циклофосфата не представлялось возможным. Расчет скоростей реакций проводили согласно уравнению

$$k = \frac{1}{t \cdot a} \ln \frac{b}{b-x},$$

где t — время протекания реакции, a — концентрация гидроксилamina, b — исходная концентрация нуклеозид-2',3'-циклофосфата, x — концентрация продуктов.

Константы связывания Cud-3'-P и Ado-3'-P с РНКазой определяли методом дифференциальной спектроскопии при рН 5,7 и 0,2 М NaCl. Спектры поглощения и дифференциальные спектры получали на спектрофотометре Cary-118 (Varian, США). Дифференциальные спектры регистрировали, используя двойные кюветы (Helma, США) с длиной оптического пути каждой 0,438 см и объемом 1 мл. Концентрация белка в кювете после добавления лиганда составляла $2 \cdot 10^{-5}$ М, а концентрация нуклеотидов варьировалась от $6 \cdot 10^{-6}$ до $1,7 \cdot 10^{-4}$ М.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Bentz F. W., Roberts G. C. K.* In: Physico-chemical properties of nucleic acids / Ed. Duchenco I. N. Y.: Acad. Press, 1973, v. 3, p. 77–138.
2. *Павловский А. Г., Борисова С. Н., Вагин А. А., Карнейский М. Я.* Биоорган. химия, 1977, т. 3, № 10, с. 1378–1386.
3. *Antonov I. V., Gurevich A. Z., Dudkin S. M., Karpeisky M. Ya., Sakharovsky V. G., Yakovlev G. I.* Eur. J. Biochem., 1978, v. 87, № 1, p. 45–54.
4. *Pavlovsky A. G., Borisova S. N., Borisov V. V., Antonov I. V., Karpeisky M. Ya.* FEBS Lett., 1978, v. 92, № 2, p. 258–262.
5. *Антонов И. В., Карнейский М. Я., Падюкова Н. Ш., Яковлев Г. И., Сахаровский В. Г.* Биоорган. химия, 1979, т. 5, № 2, с. 280–288.
6. *Карнейский М. Я., Яковлев Г. И., Сахаровский В. Г.* Биоорган. химия, 1981, т. 7, № 5, с. 686–694.
7. *Карнейский М. Я., Яковлев Г. И., Ботт В., Ежов В. А., Приходько А. Г.* Биоорган. химия, 1981, т. 7, № 9, с. 1335–1347.
8. *Heinemann U., Saenger W.* Nature, 1982, v. 299, № 5878, p. 27–31.
9. *Карнейский М. Я., Мусеев Г. П., Бочаров А. Л., Богданова Г. А., Михайлов С. Н., Яковлев Г. И.* Биоорган. химия, 1983, т. 9, № 6, с. 803–814.
10. *Uchida T., Egami F.* In: Enzymes / Ed. Boyer P. D. N. Y.: Acad. Press, 1974, v. 4, p. 205–270.
11. *Kaiser P. M., Bonacker L., Witzel H., Holy A.* Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem., 1975, B. 356, № 3, S. 143–155.
12. *Мусеев Г. П., Бочаров А. Л., Мамаева О. К., Яковлев Г. И.* Биоорган. химия, 1982, т. 8, т. 9, с. 1197–1206.
13. *Knowles J. R. J.* Theor. Biol., 1965, v. 9, № 2, p. 243–228.
14. *Карнейский М. Я., Яковлев Г. И., Антонов В. К.* Биоорган. химия, 1980, т. 6, № 5, с. 645–654.
15. *Knorre D. G.* FEBS Lett, 1975, v. 58, № 1, p. 50–52.
16. *Westheimer F. H.* Account. Chem. Res., 1968, v. 1, № 1, p. 70–78.
17. *Bencovic S. J., Schray K. J.* In: The Enzymes / Ed. Boyer P. D. N. Y.: Acad. Press, 1973, v. 8, 201–238.
18. *Bencovic S. J., Shray K. J.* In: Transition states of biochemical processes / Eds. Gaudour R. D., Schowen R. L. N. Y.: Plenum Press, 1978, p. 493–527.
19. *Sigal I., Westheimer F. H.* J. Amer. Chem. Soc., 1979, v. 101, № 3, p. 752–754.
20. *Usher D. A., Erenrich E. S., Eckstein F.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1972, v. 69, № 1, p. 115–118.
21. *Eckstein F., Shulz H. H., Ruterjans H., Haar W., Maurer W.* Biochemistry, 1972, v. 11, № 19, p. 3507–3512.
22. *Burgers P. M. J., Eckstein F.* Biochemistry, 1979, v. 18, № 4, p. 592–596.
23. *Usher D. A., Dennis E. A., Westheimer F. H.* J. Amer. Chem. Soc., 1965, v. 87, № 11, p. 2320–2324.
24. *van Aken D., Ponnissen L. M. C., Buck H. M. J.* Org. Chem., 1981, v. 46, № 16, p. 3189–3193.
25. *Lindquist R. N., Lynn J. L., Leinhard G. E.* J. Amer. Chem. Soc., 1973, v. 95, № 26, p. 8762–8768.
26. *Abrash A. L., Cheung C. C. S., Davis J. C.* Biochemistry, 1967, v. 6, № 5, p. 1298–1303.
27. *Карнейский М. Я.* Молекулярн. биология, 1976, т. 10, № 6, с. 1197–1210.
28. *Ильина Т. В., Безбородова С. И.* Прикл. биохим. и микробиол., 1972, т. 8, № 2, с. 226–231.
29. *Ежов В. А., Лузина И. Е.* Микробиология, 1978, т. 47, вып. 5, с. 906–910.
30. *Shugar D.* In: Methods in enzymology / Eds Grossman L., Moldave K. N. Y.—London: Acad. Press, 1967, v. 2, part A, y. 131–137.

31. Kazimierzuk Z., Dudycz L., Stolarsky R., Shugar D. Z. Naturforsch., 1980, B. 35c, № 1/2, S. 30-35.
32. Handbook of biochemistry and molecular biology. V. 1. Nucleic Acids. 3rd Edition, CRC Press, 1975.

Поступила в редакцию
18.VII.1983

TOPOCHEMICAL ASPECTS OF THE SUBSTRATE SPECIFICITY
OF RNase *PENICILLIUM BREVICOMPACTUM*

YAKOVLEV G. I., MOISEEV G. P., BOCHAROV A. L., MIKHAILOV S. N.,
KARPEISKY M. Ya.

*Institute of Molecular Biology, Academy of Sciences of the USSR,
Moscow*

The kinetic parameters for hydrolysis of mononucleoside 2',3'-cyclophosphates with purine and pyrimidine bases and their analogues by *P. brevicompactum* RNase have been determined. The rate constants and Michaelis constants are linearly related in the logarithmic scale. The empiric expressions of these correlations have been analyzed in terms of the model of a two-step reaction. The difference between the rate constants for hydrolysis of purine and pyrimidine cyclophosphates corresponding to the active enzyme state was shown to stem from different orientation of their phosphodiester fragments with respect to the enzyme catalytic groups in the enzyme-substrate complexes. The nature of interactions between the heterocyclic bases of a substrate and the enzyme molecule is discussed.