



УДК 577.413:577.452.312\*7.02

## ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМА ГИДРОЛИЗА ДВУСПИРАЛЬНЫХ ПОЛИРИБОНУКЛЕОТИДОВ ЦИКЛИЗУЮЩИМИ РНКАЗАМИ

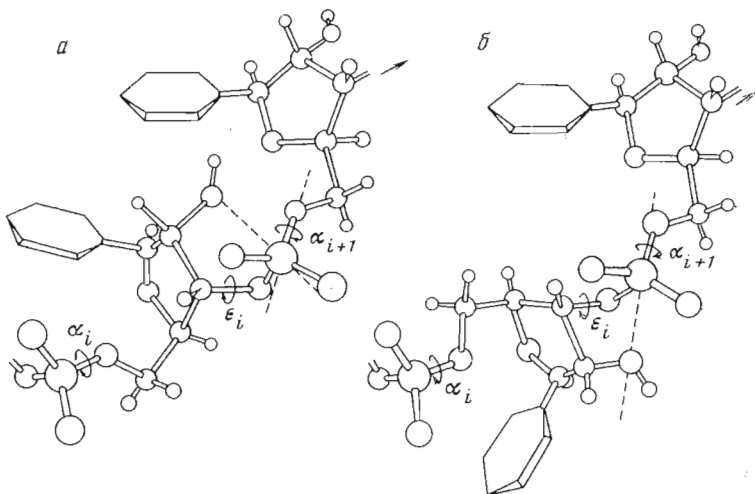
Яковлев Г. И., Моисеев Г. Ш., Боcharов А. Л.

Институт молекулярной биологии Академии наук СССР, Москва

Исследован механизм расщепления двуспиральных полирибонуклеотидов циклизующими РНКазами, для чего измерены кинетические параметры  $k_{cat}$  и  $K_m$  реакций расщепления  $poly(U) \cdot poly(A)$ ,  $poly(C) \cdot poly(I)$  и составляющих их однонитевых полинуклеотидов РНКазами различной специфичности. Сравнение этих параметров для одно- и двухцепочечных полинуклеотидов показало, что относительная устойчивость двуспиральных полинуклеотидов к расщеплению циклизующими РНКазами проявляется главным образом в уменьшении величины  $k_{cat}$  при практически одинаковых величинах  $K_m$ . Результаты рассмотрены с привлечением данных о равновесных «открытых» состояниях нуклеотидов в двунитевых структурах. Сделано заключение, что расщепление двуспиральных РНК циклизующими РНКазами происходит путем связывания «открытых» нуклеотидов без локального плавления двуспиральной структуры.

Пиримидинспецифичная РНКаза А и гуанилспецифичная РНКаза  $T_1$  деполимеризуют преимущественно однонитевые формы РНК [1–5]. Это свойство указанных РНКаз широко используется для исследования вторичной структуры полинуклеотидов. Тем не менее было показано, что РНКаза А, хотя и с заметно меньшей эффективностью, способна расщеплять двунитевую вирусную РНК по эндонуклеазному механизму, проявляя, как и при расщеплении однонитевых РНК, пиримидиновую специфичность [2]. Продукты расщепления гетерогенны, что свидетельствует о статистическом характере реакции. РНКаза  $T_1$  не активна по отношению к таким вирусным РНК. С другой стороны, оба фермента эффективно деполимеризуют вирусную двуспиральную РНК после ее тепловой денатурации. Вместе с тем РНКаза  $T_1$ , как и РНКаза А, вызывает деградацию синтетических двуспиральных полирибонуклеотидов  $poly(I) \cdot poly(C)$ , а РНКаза А — также  $poly(U) \cdot poly(A)$ . Из других циклизующих РНКаз, способных расщеплять двуспиральные РНК, следует отметить, неспецифичную к нуклеиновым основаниям РНКазу  $T_2$  [6]. Этот фермент почти с одинаковой эффективностью расщепляет обе формы РНК.

Характерной особенностью циклизующих РНКаз является то, что расщепление фосфодиэфирной связи в РНК происходит в результате трансэтерификации с образованием 2',3'-циклофосфата. Ферментативная реакция протекает по линейному механизму, т. е. только при линейном расположении атома фосфора, атакующего его  $O2'$ -атома рибозы и  $O5'$ -атома уходящей группы [7]. При расщеплении циклизующими РНКазами однонитевых РНК необходимая линейная ориентация достигается за счет специфичного связывания в активном центре фермента фосфатной группы и основания нуклеозида, расположенного на  $O3'$ -конце расщепляемой связи [8]. Максимальная скорость реакции достигается, когда, кроме того, специфически связывается также основание нуклеозида на  $O5'$ -конце расщепляемой связи [9]. В двуспиральных РНК, основные детали строения которых были определены методами рентгеноструктурного анализа вытянутых волокон [10–13], расположение  $O2'$ -атома рибозы относительно  $P-O5'$ -связи не удовлетворяет условию линейности (рисунок). Необходимая для реакции трансэтерификации ориентация указанных атомов может быть достигнута или при локальном плавлении двуспиральной структуры на участке нескольких нуклеотидных пар, или при выкручивании одного нуклеотида из двойной спирали, например вокруг связей  $P-O5'$  и  $C3'-O3'$ .



Ориентация атома рибозы  $O2'_i$  относительно  $P_{i+1}-O5'_{i+1}$ -связи в двуспиральной РНК (показан динуклеотидный фрагмент одной из цепей) (а) и при выкручивании  $i$ -го нуклеотида из двойной спирали за счет изменения торсионных углов  $\alpha_i$  и  $\epsilon_i$  (б).

Пунктиром показаны прямые линии, проходящие через атомы  $O2'_i$ ,  $P_{i+1}$  и  $O5'_{i+1}$ .

Ранее предполагалось, что взаимодействие РНКаз с двуспиральной РНК в растворах может приводить к локальной дестабилизации ее структуры, после чего и происходит ферментативное расщепление межнуклеотидной связи [4, 5, 13, 14]. В основе этого предположения лежат представления о том, что РНКазы обладают большим сродством к однонитевым РНК, чем к двунитевым, подобно тому как это наблюдалось для РНКазы А по отношению к одно- и двунитевым ДНК [15]. Поэтому фермент способен, подобно «ловушке», связывать односпиральные участки ДНК, появляющиеся в результате тепловых флуктуаций структуры двуспиральной ДНК [16].

В настоящее время опубликован ряд экспериментальных данных, свидетельствующих о динамических вариациях структуры двуспиральных полинуклеотидов в растворах [17, 18]. Часть таких вариаций обусловлена быстрыми движениями сахарофосфатного скелета. Наряду с ними обнаружены более медленные флуктуации, связанные с локальными конформационными изменениями двойной спирали, в результате которых нарушаются уотсон-криковские водородные связи, и соответствующие гетероатомы нуклеиновых оснований становятся доступными для водородного обмена с растворителем [18–26]. Характерной особенностью таких флуктуаций является открывание одной пары нуклеотидов без изменения состояния соседних пар. Хотя структура таких «открытых» состояний неизвестна, следует принять, что для протонного обмена иминогрупп оснований с молекулами воды расстояние между атомами N3 пиримидинов и N1 пуринов комплементарной пары в «открытом» состоянии должно возрастать не менее чем до 6 Å [27]. Вывернутые из двойной спирали нуклеотиды могут специфически связываться с белками. Поэтому возможность существования равновесных открытых состояний нуклеотидных пар в двуспиральных РНК может быть положена в основу механизма их расщепления циклизующими РНКазами.

Данная работа была проведена для выяснения, происходит ли при расщеплении двуспиральных РНК циклизующими РНКазами связывание ферментом однонитевых участков или же отдельных нуклеотидов. Заметим, что экспериментально невозможно различить, образуются ли указанные однонитевые участки или выкрученные из двойной спирали отдельные нуклеотиды в результате тепловых флуктуаций или благодаря взаимодействию фермента с двуспиральной РНК. Поэтому в этом смысле задача не детализировалась.

Для решения поставленного вопроса были определены кинетические

Таблица 1

## Кинетические параметры реакций расщепления полинуклеотидов пиридинспецифичной РНКазой А

Субстрат	Условия	$k_{cat}$ , с <sup>-1</sup>	$K_m \cdot 10^4$ , М	$k_{cat}/K_m$ , с <sup>-1</sup> ·М <sup>-1</sup>
Poly(U)	рН 7,5, I=0,1 М	15,3	1,5	1·10 <sup>5</sup>
Poly(A)		—	—	4,2
Poly(U)·poly(A)	рН 6,2, I=0,215 М	0,18	2,6	6,8·10 <sup>2</sup>
Poly(U)		31	12,5	2,5·10 <sup>3</sup>
Poly(U)·poly(A)	рН 6,2, I=0,025 М	0,46	16,7	2,8·10 <sup>2</sup>
Poly(U)		15,5	1,4	1,1·10 <sup>5</sup>
Poly(U)·poly(A)	рН 6,2, I=0,115 М	0,70	2,6	2,7·10 <sup>3</sup>
Poly(C)		536	1,7	3,2·10 <sup>6</sup>
Poly(C)·poly(I)	рН 6,2, I=0,025 М	1,20	1,0	1,2·10 <sup>4</sup>
Poly(C)		171	0,18	9,4·10 <sup>6</sup>
Poly(C)·poly(I)		1,20	0,22	5,2·10 <sup>4</sup>

Таблица 2

Кинетические параметры реакций расщепления полинуклеотидов гуанилспецифичными РНКазой T<sub>1</sub> и РНКазой P. brevicompactum

Субстрат	Условия	$k_{cat}$ , с <sup>-1</sup>	$K_m \cdot 10^4$ , М	$k_{cat}/K_m$ , с <sup>-1</sup> ·М <sup>-1</sup>
РНКаза T <sub>1</sub>				
Poly(I)	рН 6,2, I=0,05 М	435	12,5	3,5·10 <sup>5</sup>
Poly(I)·poly(C)		0,11	18,2	0,6·10 <sup>2</sup>
РНКаза P. brevicompactum				
Poly(I)	рН 6,2, I=0,025 М	119	5	2,4·10 <sup>5</sup>
Poly(I)·poly(C)		1,9	20	1,0·10 <sup>3</sup>
Poly(I)	рН 6,2, I=0,215 М	118	7,7	1,5·10 <sup>5</sup>
Poly(I)·poly(C)		—	—	1,8·10 <sup>2</sup>

Таблица 3

## Кинетические параметры реакций расщепления полинуклеотидов неспецифичной к основаниям РНКазой P. brevicompactum

Субстрат	Условия	$k_{cat}$ , с <sup>-1</sup>	$K_m \cdot 10^4$ , М	$k_{cat}/K_m$ , с <sup>-1</sup> ·М <sup>-1</sup>
Poly(U)	рН 7,0, I=0,11	263	34,5	7,6·10 <sup>4</sup>
Poly(A)		138	10	1,4·10 <sup>5</sup>
Poly(U)·poly(A)	рН 6,2, I=0,11	5,9	3,6	1,8·10 <sup>3</sup>
Poly(U)		1100	12,5	8,8·10 <sup>5</sup>
Poly(U)·poly(A)	рН 6,2, I=0,11	47	2,6	1,8·10 <sup>5</sup>
Poly(I)		12,6	6,9	1,8·10 <sup>3</sup>
Poly(C)	рН 6,2, I=0,11	240	20	1,2·10 <sup>5</sup>
Poly(I)·poly(C)		0,4	13	3,3·10 <sup>2</sup>

параметры  $k_{cat}$  и  $K_m$  для реакции деполимеризации синтетических полинуклеотидов poly(A)·poly(U), poly(I)·poly(C) и образующих их однонитевых полинуклеотидов циклизующими РНКазами с различной специфичностью к основаниям нуклеотидов (табл. 1–3). Для уменьшения влияния на измеряемые кинетические параметры расщепления двуспиральных РНК по экзонуклеазному механизму в качестве субстратов использовали полинуклеотиды, содержащие в молекуле не менее чем 200 пар оснований и проявляющие высокую устойчивость к действию нуклеазы S<sub>1</sub>.

В рамках представлений о деполимеризации двуспиральных РНК путем связывания однонитевых участков следует ожидать, что различие наблюдаемых скоростей реакции второго порядка  $k_{cat}/K_m$  для одно- и двунитевых РНК будет связано главным образом с различием в величинах  $K_m$ . Действительно, затратив некоторую энергию на локальное плавление двуспиральной РНК, соответствующую части энергии образования фермент-субстратного комплекса данной РНКазы с однонитевым поли-

нуклеотидом, фермент может образовать продуктивный комплекс с одной из нитей двунитовой РНК. В этом случае независимо от типа РНКазы наблюдаемое значение  $K_m$  для реакции расщепления двуспиральной РНК будет больше, чем для однонитевой, а величины молекулярных констант скоростей  $k_{cat}$  не должны различаться. Следует подчеркнуть, что выкручивание из двойной спирали двух соседних нуклеотидов одной цепи при неизменной структуре остальной части двойной спирали не может приводить к образованию продуктивного комплекса. Действительно, как было отмечено ранее [28], расстояние между плоскостями оснований вывернутых нуклеотидов остается тем же, что и в двуспиральной структуре, и из-за стерических ограничений возможных углов выкручивания плоскости оснований перекрываются. Однако для РНКазы А [8, 29] и, по-видимому, для других циклизующих РНКаз [9] в продуктивном фермент-субстратном комплексе динуклеозидфосфат находится в «развернутой» форме. Поэтому расплетание двуспиральной РНК, в результате которого в активном центре РНКазы мог бы связаться динуклеозидфосфатный фрагмент одной из цепей, должно затрагивать обе спирали на протяжении нескольких нуклеотидов.

Если расщепление двуспиральных РНК происходит путем связывания одного нуклеотида в активном центре фермента, то по сравнению с деполимеризацией однонитевых РНК в общем случае должны различаться величины как  $k_{cat}$ , так и  $K_m$ .

Рассмотрим происхождение этих различий, приняв, что РНКазы связываются с выкрученными из двойной спирали отдельными нуклеотидами, появляющимися в результате флуктуаций. Величина  $k_{cat}$  для реакции расщепления двуспиральных РНК в этом случае будет заметно меньше, чем однонитевых, по следующей причине. Реакция расщепления связи  $P-O5'$  циклизующими РНКазами протекает через стадию присоединения атома рибозы  $O2'$  к атому фосфора с одновременным удлинением  $P-O5'$ -связи. Поэтому наибольшая скорость реакции будет наблюдаться для такой конформации фосфодиэфирного фрагмента, при которой энергия связи  $P-O5'$  имеет минимальное значение. Ослабление связи  $P-O5'$  может быть достигнуто при антиперипланарной ориентации одной из орбиталей неподеленных пар электронов соседнего  $O3'$ -атома [30]. Уменьшение энергии  $P-O5'$ -связи обусловлено при этом перекрыванием орбитали неподеленной пары электронов атома  $O3'$  с незаполненной антисвязывающей орбиталью  $\sigma^*$  связи  $P-O5'$  и переносом на нее части электронной плотности неподеленной пары. Однако такая ориентация орбитали неподеленной пары электронов атома  $O3'$  затрудняет присоединение нуклеофила к атому фосфора при атаке по линейному механизму [31]. Мы обратили внимание на то, что расщепляемая эфирная  $P-O$ -связь должна значительно ослабляться, если обе орбитали неподеленных пар электронов ее атома кислорода располагаются синперипланарно к фосфорильным  $P-O$ -связям [9]. Ослабление эфирной  $P-O$ -связи в этом случае объясняется электростатическим отталкиванием неподеленных пар электронов эфирного атома кислорода и электронов, находящихся на молекулярных орбиталях, определяющих связывание атома фосфора и фосфорильных атомов кислорода. Поскольку указанное ослабление  $P-O$ -связи не связано с переносом электронной плотности с несвязывающих орбиталей соседнего эфирного атома кислорода на антисвязывающую орбиталь  $\sigma^*$  данной  $P-O$ -связи, оно не затрудняет атаку нуклеофила на атом фосфора в направлении ослабленной связи.

В работе [9] были приведены экспериментальные данные по расщеплению  $P-O5'$ -связи в динуклеозидфосфатах циклизующими РНКазами, хорошо согласующиеся с этими представлениями. Согласно этой концепции, высокая скорость расщепления циклизующими РНКазами  $P-O5'$ -связи достигается, когда фосфодиэфирный фрагмент субстрата в фермент-субстратном комплексе фиксирован в конформации с двугранным углом  $O3'-P-O5'-C5'$ , близким к нулю. При расщеплении однонитевых РНК эта конформация фиксируется в активном центре РНКазы благодаря специфическому связыванию с ферментом нуклеотида на  $O5'$ -конце расщепляемой

фосфодиэфирной связи. При связывании РНКазой одного вывернутого из двойной спирали РНК нуклеотида указанная конформация фосфодиэфирного фрагмента не реализуется. В соответствии с механизмом действия циклизующих РНКаз при связывании в активном центре  $i$ -го нуклеотида полинуклеотидной цепи разрывается связь  $P_{i+1}-O5'_{i+1}$ . Переход в открытое состояние  $i$ -го нуклеотида изменяет значение  $i$ -х торсионных углов, но практически не влияет на значения  $(i+1)$ -х углов [27, 32]. Поэтому следует ожидать, что в фермент-субстратном комплексе, образовавшемся при связывании с РНКазой  $i$ -го нуклеотида, величина угла  $O3'_{i+1}-P_{i+1}-O5'_{i+1}-C5'_{i+1}$  равна  $290-300^\circ$ , т. е. тому значению, которое характерно для двунитевых полинуклеотидов  $poly(A) \cdot poly(U)$  и  $poly(I) \cdot poly(C)$  [10]. Следовательно, указанный угол в фермент-субстратном комплексе будет отличаться от оптимального примерно на  $60^\circ$ , что должно привести к более низким наблюдаемым значениям  $k_{cat}$  для двуспиральных полинуклеотидов по сравнению с однонитевыми.

Для оценки ожидаемых различий между величиной  $K_m$  для реакции расщепления двунитевой РНК за счет связывания одного нуклеотида и соответствующей величиной для однонитевой РНК необходимо учесть следующее. При образовании комплекса между РНКазой и однонитевой РНК основной вклад в величину  $K_m$  дает связывание нуклеотида на  $O3'$ -конце фосфодиэфирной связи [33, 34]. При этом часть энергии взаимодействия РНКазы и однонитевой РНК затрачивается на «замораживание» внутримолекулярного вращения нуклеотида и фосфатной группы вокруг связей  $C3'-O3'$ ,  $O3'-P$  и  $P-O5'$ . Поэтому соответствующее уменьшение энтропии при образовании комплекса РНКазы с открытым нуклеотидом двуспиральной структуры должно быть меньше, чем при связывании нуклеотида однонитевой РНК, тем более что последняя находится в растворе в форме клубка. В результате «замораживания» вращений вокруг указанных связей выигрыш энергии связывания при  $25^\circ$  может достигать 4,5 ккал/моль [35]. Поэтому, несмотря на то что относительная концентрация открытых состояний составляет 0,1–1% от общего количества нуклеотидов цепи [23, 36], наблюдаемая величина  $K_m$  для реакции расщепления двунитевых РНК может быть приблизительно равна или даже меньше соответствующего значения для однонитевых РНК.

Из данных табл. 1 видно, что величины  $K_m$  реакций расщепления РНКазой А  $poly(U)$  в однонитевой форме и в составе  $poly(A) \cdot poly(U)$  при одинаковых условиях практически совпадают, а величины  $k_{cat}$  различаются в зависимости от условий эксперимента в 22–85 раз. Аналогичные результаты были получены при сопоставлении параметров реакций расщепления  $poly(C)$  и  $poly(I) \cdot poly(C)$ . В этом случае величины  $K_m$  также практически не различались, а отношение величин  $k_{cat}$  для реакций деполимеризации  $poly(C)$  и  $poly(C) \cdot poly(I)$  равно 446 при  $I=0,115$  и 142 при  $I=0,025$  М.

Возникает вопрос: совпадают ли наблюдаемые величины  $K_m$  в реакциях гидролиза полинуклеотидов с реальными константами диссоциации фермент-субстратных комплексов? Мы измерили константы ингибирования реакции расщепления динуклеозидфосфата  $SrA$  РНКазой А полинуклеотидами  $poly(U)$  и  $poly(U) \cdot poly(A)$ . Возможность таких измерений обусловлена тем, что РНКазой А расщепляет  $SrA$  значительно быстрее, чем  $poly(U)$  и  $poly(U) \cdot poly(A)$ . Так, при pH 6,2 и  $I=0,215$  М величина  $k_{cat}$  для реакции расщепления  $SrA$  равна  $2350 \text{ с}^{-1}$  [37], а для  $poly(U)$  и  $poly(U) \cdot poly(A)$  значение  $k_{cat}$  равно 31 и  $0,46 \text{ с}^{-1}$  соответственно (табл. 1). С другой стороны, значения  $K_m$  для  $SrA$  и полинуклеотидов близки. Было обнаружено, что ингибирование указанной реакции полинуклеотидами  $poly(U)$  и  $poly(U) \cdot poly(A)$  является конкурентным. При pH 6,2 константа ингибирования полинуклеотидом  $poly(U) \cdot poly(A)$   $K_i=1 \cdot 10^{-3}$  и  $1,1 \cdot 10^{-4}$  М при значениях полной силы 0,215 и 0,025 М соответственно. Константа ингибирования полинуклеотидом  $poly(U)$  при pH 6,2 и  $I=0,215$  М оказалась равной  $1,1 \cdot 10^{-3}$  М. Сопоставляя эти значения с соответствующими величинами  $K_m$  (табл. 1), можно видеть, что величины  $K_i$  и  $K_m$  различаются не более чем в 3 раза. Следовательно, можно считать, что наблю-

даемые значения  $K_m$  близки по величине к истинным константам диссоциации фермент-субстратных комплексов. Следовательно, совпадение величин  $K_m$  для реакции расщепления пиримидиновых полинуклеотидов в одно- и двунитевых РНК, по-видимому, действительно обусловлено различием в затратах энергии взаимодействия фермента и субстрата для «замораживания» внутримолекулярных вращений при образовании фермент-субстратных комплексов в соответствии с вышеприведенными представлениями.

Гуанилспецифичные РНКазы  $T_1$  и РНКазы *P. brevicompactum* расщепляют  $\text{poly}(I) \cdot \text{poly}(C)$  соответственно в 6000 и 240 раз медленнее, чем  $\text{poly}(I)$  (табл. 2). Это уменьшение скорости расщепления, как и для РНКазы  $A$ , связано главным образом со снижением величины  $k_{cat}$  при переходе от одно- к двунитевому субстрату. Величины  $K_m$  для расщепления  $\text{poly}(I) \cdot \text{poly}(C)$  близки к соответствующим значениям для расщепления  $\text{poly}(I)$ . Измерение кинетических параметров  $k_{cat}$  и  $K_m$  в реакциях расщепления гуаниловыми РНКазыми  $\text{poly}(I) \cdot \text{poly}(C)$  удалось выполнить лишь при низких значениях ионной силы. При концентрациях соли в растворе более 0,05 М измерения затруднены из-за возрастания величины  $K_m$ .

Природные двуспиральные РНК практически устойчивы к действию гуаниловых РНКаз [2]. Вероятнее всего, это связано с тем, что при спаривании оснований гуанозина и цитидина число «открытых» состояний в двуспиральных полинуклеотидах уменьшается по крайней мере на порядок по сравнению с тем, когда пары комплементарных нуклеотидов представлены инозином и цитидином [21, 26].

Сравнительный анализ кинетических параметров расщепления одно- и двунитевых полинуклеотидов неспецифичной к природе гетероциклических оснований РНКазой *P. brevicompactum* приводит к качественно таким же результатам, как и для специфичных РНКаз. Молекулярная кинетическая константа  $k_{cat}$  при расщеплении двунитевых полинуклеотидов неспецифичной РНКазой всегда значительно ниже, чем при расщеплении однонитевых. Однако в отличие от РНКазы  $A$  наблюдается небольшое, но заметное уменьшение величины  $K_m$  при расщеплении  $\text{poly}(A) \cdot \text{poly}(U)$  по сравнению с величинами этой константы для  $\text{poly}(A)$  и  $\text{poly}(U)$ .

Таким образом, из приведенных данных следует, что циклизующие РНКазы расщепляют двуспиральные полирибонуклеотиды не путем локального плавления их структуры, а, скорее всего, связывая нуклеотиды, находящиеся в термодинамически равновесных «открытых» состояниях.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Гомогенные препараты пиримидинспецифичной РНКазы  $A$  (КФ 3.1.27.5), гуанилспецифичной РНКазы *P. brevicompactum* (КФ 3.1.27.3) и неспецифичной РНКазы *P. brevicompactum* (КФ 3.1.27.1) были получены так, как описано в работах [38—40]. Использован также препарат РНКазы  $T_1$  (КФ 3.1.27.3) фирмы Serva (ФРГ).

В работе были использованы гомополимеры рибонуклеотидов фирмы Reanal (Венгрия). Все коммерческие препараты подвергали фракционированию гель-фильтрацией через сефадекс G-50 (fine, Pharmacia, Швеция). На колонку сефадекса (3,8×56 см; 630 мл), уравновешенного 0,05 М трис-НСl-буфером, рН 8,2, содержащим 0,1 М LiCl, наносили 100 мг полимера, предварительно растворенного в 5—7 мл того же буфера. Высокополимерный материал появлялся во фракциях элюата, составляющих 0,25—0,27 объема колонки. Сбор первой фракции завершали на порции элюата, составляющей 0,38 объема колонки. Вторую фракцию полимерного материала собирали в интервале элюции 0,38—0,48 объема колонки. Полимеры осаждали из раствора на холоде 3 объемами этанола. Осадок растворяли в воде и лиофилизировали.

Для приготовления двуспиральных полимеров использовали только материал из первой фракции. Для этого смешивали стехиометрические (по указанным ниже коэффициентам экстинкций) количества полимеров. Гипохромный эффект, возникающий при смешивании гомополимеров, контро-

лировали спектрофотометрически. Он соответствовал значениям, известным из литературы [41, 42].

Полученные двунитевые полимеры подвергали предварительной обработке нуклеазой  $S_1$ . Для этого к раствору полимера в 0,1 М LiCl, содержащем 0,05 М ацетат лития, pH 6, добавляли аликвоту фермента, полученного нами по методу [43] (20 единиц фермента на 5–7 оптических единиц полимера) и раствор выдерживали при 25° С в течение 4 ч. Затем полимер фракционировали на гидроксапатите (синтезирован нами по методу [44]). На колонку (2,7×11 см), уравновешенную 0,05 М фосфатным буфером, pH 7, напосили полимер в количестве 300–500 ОЕ и его элюировали градиентом концентраций этого фосфатного буфера. Двуспиральные молекулы элюировались при концентрации буфера 0,2–0,22 М, что соответствует данным работы [45]. Полимеры осаждали 1,5 объема этанола на холоде. Полимер освобождали от фосфата гель-фильтрацией через сефадекс G-50 (см. выше). Затем полимер осаждали из раствора 3 объемами этанола, осадок собирали центрифугированием и растворяли в 3–5 мл воды. Раствор хранили в замороженном состоянии и использовали для измерений кинетических параметров в течение 2–5 дней.

Полученные препараты двуспиральных полинуклеотидов были испытаны на устойчивость к действию нуклеазы  $S_1$ . Скорость гидролиза нуклеазой poly(A)·poly(U) при ионной силе 0,2 М NaCl не превышала 0,2% от скорости гидролиза poly(A). Скорость гидролиза poly(C)·poly(I) составляла менее 0,07% скорости гидролиза poly(I).

Для определения концентрации субстратов использовали следующие молярные коэффициенты экстинкции: poly(A) —  $\epsilon_{257}=1 \cdot 10^4$  М<sup>-1</sup>·см<sup>-1</sup> при pH 7,5 [46], poly(U) —  $\epsilon_{261}=9,43 \cdot 10^3$  М<sup>-1</sup>·см<sup>-1</sup> при pH 7,5 [46], poly(I) —  $\epsilon_{248}=1 \cdot 10^4$  М<sup>-1</sup>·см<sup>-1</sup> при pH 7,8 [41], poly(C) —  $\epsilon_{268}=6,2 \cdot 10^3$  М<sup>-1</sup>·см<sup>-1</sup> при pH 7,8 [41], poly(C)·poly(I) —  $\epsilon_{256}=5 \cdot 10^3$  М<sup>-1</sup>·см<sup>-1</sup> при pH 7,0 [41], poly(U)·poly(A) —  $\epsilon_{257}=7 \cdot 10^3$  М<sup>-1</sup>·см<sup>-1</sup> при pH 7,8 [42].

При кинетических измерениях использовали стандартный буферный раствор, содержащий 0,015 М цитрат натрия. Необходимое значение pH устанавливали добавлением КОН. Нужное значение ионной силы раствора устанавливали, добавляя NaCl. Исходные вещества для приготовления буфера были марки ос.ч. Величину pH измеряли на pH-метре рНМ 82 (Radiometer, Дания).

Величины  $k_{cat}$ ,  $K_m$  и  $K_i$  рассчитывали из зависимостей начальных скоростей реакции от концентрации субстрата.

Начальные скорости реакций определяли по изменению оптической плотности при 260 нм для poly(A) и poly(A)·poly(U); при 286 нм для poly(U); при 248 нм для poly(I) и poly(I)·poly(C) и при 250 нм для poly(C) на спектрофотометрах Carry-118 (Varian, США) и Specord-M40 (Carl Zeiss, Jena, ГДР). Ширину оптической щели устанавливали равной 0,6–1,2 мм. Использовали кюветы с длиной оптического пути 0,2 и 1,0 см. Кюветы термостатировали при 25° С. При измерениях использовали концентрации субстрата в диапазоне, лежащем вблизи величины  $K_m$ . При каждом измерении кинетических параметров для данного субстрата и фермента определение начальных скоростей проводили для 6–7 значений концентрации субстрата.

При расчете величины  $k_{cat}$  использовали следующие разностные коэффициенты поглощения: при pH 6,2 и 7,5 poly(A) —  $\Delta\epsilon_{261}=5000$  М<sup>-1</sup>·см<sup>-1</sup>, poly(A)·poly(U) —  $\Delta\epsilon_{260}=5920$  М<sup>-1</sup>·см<sup>-1</sup> для неспецифической РНКазы *P. brevicompactum* и  $\Delta\epsilon_{260}=3000$  М<sup>-1</sup>·см<sup>-1</sup> для РНКазы А; poly(I) —  $\Delta\epsilon_{248}=1330$  М<sup>-1</sup>·см<sup>-1</sup>; poly(I)·poly(C) —  $\Delta\epsilon_{248}=3890$  М<sup>-1</sup>·см<sup>-1</sup> для неспецифической РНКазы *P. brevicompactum* и гуаниловых РНКаз *P. brevicompactum* и  $T_1$  и  $\Delta\epsilon_{248}=3150$  М<sup>-1</sup>·см<sup>-1</sup> для РНКазы А.

Значения  $\Delta\epsilon$  для вышеуказанных субстратов определяли следующим образом: субстрат в одинаковой концентрации с поглощением, не превышающим 1 ОЕ, помещали в измерительную кювету и в кювету сравнения. Затем в первую кювету добавляли РНКазу в таком количестве, чтобы ошибка, связанная с поглощением фермента, не превышала 2%, и регистрировали возникающий дифференциальный спектр с интервалами 1 ч.

Считали, что реакция завершилась, если через 1 ч дифференциальный спектр не изменялся. Для  $\rho\text{oly}(C)$  использовали величину  $\Delta\epsilon_{250} = 2380 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ , соответствующую реакции  $\rho\text{oly}(C) \rightarrow C > p$ , ее определили путем прямого сравнения спектров поглощения равных концентраций  $\rho\text{oly}(C)$  и  $C > p$ . Для определения концентрации  $C > p$  использовали  $\epsilon_{268} = 8400 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  при pH 7,0 [47]. Для  $\rho\text{oly}(U)$  было принято  $\Delta\epsilon_{286} = 587 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ , что соответствует величине  $\Delta\epsilon$  для  $U > p$  [48].

В заключение считаем своим приятным долгом выразить нашу признательность М. Я. Карпейскому и В. И. Иванову за полезные дискуссии.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. *Billeter M. A., Weissman C.* In: *Procedures in nucleic acid research*/Eds Cantoni G. L., Davies D. R. N. Y.: Harper and Row, 1966, p. 498–512.
2. *Edy Y. G., Szekely M., Loviny T., Dreyer C.* *Eur. J. Biochem.*, 1976, v. 61, № 2, p. 563–572.
3. *Hastings K. E. M., Shaw J. E.* *Arch. Biochem. and Biophys.*, 1977, v. 183, № 2, p. 516–527.
4. *Libonati M., Palmieri M.* *Biochim. et biophys. acta*, 1978, v. 518, № 1, p. 277–289.
5. *Libonati M., Carsana A., Faria A.* *Mol. and Cell. Biochem.*, 1980, v. 31, № 3, p. 147–164.
6. *Uchida T., Egami F.* *Enzymes*, 1971, v. 4, p. 205–270.
7. *Knowles J. N.* *Ann. Rev. Biochem.*, 1980, v. 49, p. 877–919.
8. *Richards F. M., Wyckoff H. W.* *Enzymes*, 1971, v. 4, p. 647–806.
9. *Yackovlev G. I., Bocharov A. L., Moiseev G. P., Mikhaylov S. N.* *FEBS Lett.*, 1985, v. 179, № 2, p. 217–220.
10. *Arnott S., Hukins D. W. L., Dorer S. D., Fuller W., Hodson A. R.* *J. Mol. Biol.*, 1973, v. 81, № 2, p. 107–122.
11. *Arnott S., Hukins D. W. L., Dorer S. D.* *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 1972, v. 48, № 6, p. 1392–1399.
12. *Saenger W.* In: *Principles of nucleic acid structure*. N. Y.: Springer-Verlag, 1984.
13. *Libonati M., Sorrentino S., Galli R., La Montagna R., Di Donato A.* *Biochim. et biophys. acta*, 1975, v. 407, № 3, p. 292–298.
14. *Libonati M., Faria A., Beintema J. J.* *Eur. J. Biochem.*, 1976, v. 69, № 2, p. 445–451.
15. *Felsenfeld G., Sandeen G., von Hippel P. H.* *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1963, v. 50, № 4, p. 644–651.
16. *Jensen D. E., von Hippel P. H.* *J. Biol. Chem.*, 1976, v. 251, № 22, p. 7198–7214.
17. *Sundaralingam M., Westhof E.* In: *Biomolecular stereodynamics*/Ed. Sarma R. H. N. Y.: Adenine Press, 1981, v. 1, p. 301–326.
18. *Englander S. W., Kallenbach N. R.* *Quart. Rev. Biophys.*, 1984, v. 16, № 4, p. 521–655.
19. *Teitelbaum H., Englander S. W.* *J. Mol. Biol.*, 1975, v. 92, № 1, p. 55–78.
20. *Teitelbaum H., Englander S. W.* *J. Mol. Biol.*, 1975, v. 92, № 1, p. 79–92.
21. *Nakanishi M., Tsuboi M.* *J. Mol. Biol.*, 1978, v. 124, № 1, p. 61–71.
22. *Mandal C., Kallenbach N. R., Englander S. W.* *J. Mol. Biol.*, 1979, v. 135, № 2, p. 391–411.
23. *Preisler R. S., Mandal C., Englander S. W., Kallenbach N. R., Howard F. B., Frazier J., Miles H. T.* In: *Biomolecular stereodynamics*/Ed Sarma R. H. N. Y.: Adenine Press, 1981, v. 1, p. 405–415.
24. *Preisler R. S., Mandal C., Englander S. W., Kallenbach N. R., Frazier J., Miles H. T., Howard F. B.* *Biopolymers*, 1984, v. 23, № 11, p. 2099–2125.
25. *Mirau P. A., Kearns D. R.* *J. Mol. Biol.*, 1984, v. 177, № 1, p. 207–227.
26. *Danne M. P., Westhof E., Koffel-Schwartz N., Fuchs R. P. P.* *Biochemistry*, 1985, v. 24, № 9, p. 2275–2284.
27. *Keepers J., Kollman P., Weiner P., James T. L.* *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1982, v. 79, № 18, p. 5537–5541.
28. *Иванов В. И., Флорентьев В. Л.* *Молекулярн. биология*, 1970, т. 4, № 6, с. 866–875.
29. *Antonov I. V., Gurevich A. Z., Dudkin S. M., Karpeisky M. Ya., Sakharovskiy V. G., Yakovlev G. I.* *Eur. J. Biochem.*, 1978, v. 87, № 1, p. 45–54.
30. *Gorenstein D. G., Findlay J. B., Luxon B. A., Kar D. J.* *Amer. Chem. Soc.*, 1977, v. 99, № 10, p. 3473–3479.
31. *Gorenstein D. G., Luxon B. A., Findlay J. B. J.* *Amer. Chem. Soc.*, 1979, v. 101, № 20, p. 5869–5875.
32. *Keeper J., Kollman P. A., James T. L.* *Biopolymers*, 1984, v. 23, № 11, p. 2499–2511.
33. *Irie M., Mikami F., Monma K., Ohgi K., Watanabe H., Yamaguchi R., Nagase H.* *J. Biochem. (Tokyo)*, 1984, v. 96, № 1, p. 89–96.
34. *Watanabe H., Ando E., Ohgi K., Irie M. J.* *Biochem. (Tokyo)*, 1985, v. 98, № 5, p. 1239–1245.
35. *Page M. I., Jenks W. P.* *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1971, v. 68, № 8, p. 1678–1683.
36. *Leroy J.-L., Broseta D., Gueron M. J.* *Mol. Biol.*, 1985, v. 184, № 1, p. 165–178.
37. *Folman H., Wieker H. J.* *Eur. J. Biochem.*, 1967, v. 1, № 2, p. 243–250.
38. *Crestfield A. M., Stein W. H., Moor S. J.* *J. Biol. Chem.*, 1963, v. 238, № 3, p. 618–626.
39. *Безбородова С. И., Суходольская Г. В., Гуляева В. И., Ильина Т. В.* *Прикл. биохимия и микробиол.*, 1974, т. 10, № 3, с. 432–437.



40. Ильина Т. В., Безбородова С. И. Прикл. биохимия и микробиол., 1972, т. 8, № 2, с. 226—231.
41. Chamberlin M. J., Patterson D. L. J. Mol. Biol., 1965, v. 12, № 2, p. 410—428.
42. Riley M., Maling B., Chamberlin M. J. J. Mol. Biol., 1966, v. 20, № 2, p. 359—389.
43. Сенченко В. И., Колбачовская Е. Ю., Бочаров А. Л. Молекулярн. биология, 1979, т. 13, № 6, с. 1377—1383.
44. Muench K. H. In: Procedures in nucleic acid research/Eds Cantoni G. L., Davies D. R. N. Y.: Harper and Row, Publishers, 1971, v. 2, p. 515—523.
45. Bernardi G. Meth. Enzymol., 1971, v. 21, p. 95—139.
46. Blake R. D., Fresco J. R. J. Mol. Biol., 1966, v. 19, № 1, p. 145—160.
47. Anderson D. G., Haimes G. G., Walz F. G., Jr. Biochemistry, 1968, v. 7, № 5, p. 1637—1645.
48. Muchyga E., Klapper M. H. Biochim. et biophys. acta, 1977, v. 481, № 2, p. 526—541.

Поступила в редакцию

11.III.1986

После доработки

4.VII.1986

## STUDY OF THE MECHANISM OF HYDROLYSIS OF DOUBLE-STRANDED POLYRIBONUCLEOTIDES BY CYCLIZING RNAases

YAKOVLEV G. I., MOISEEV G. P., BOCHAROV A. L.

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

We have studied the mechanism of cleavage of double-stranded polyribonucleotides by cyclizing RNAases. To this aim, kinetic parameters  $k_{cat}$  and  $K_m$  of the cleavage reaction were measured for poly(U)·poly(A), poly(C)·poly(I), and the corresponding single-stranded polynucleotides by means of cyclizing RNAases of various specificity. As comparison of these parameters for single- and double-stranded polynucleotides showed, the higher resistance of double-stranded polynucleotides to cyclizing RNAases is revealed mainly by the decrease of  $k_{cat}$ , while  $K_m$  remain nearly the same. These results are interpreted on the basis of the data on equilibrium open states of the double helix. A conclusion is drawn that cleavage of double-stranded RNA by cyclizing RNAases is due to the binding of open nucleotides rather than to local melting of the RNA's double helix.