



УДК 547.96 : 543.42.23

ПРИМЕНЕНИЕ ЯДЕРНОГО ЭФФЕКТА ОВЕРХАУЗЕРА ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ СТРОЕНИЯ КОМПЛЕКСОВ РИБОНУКЛЕАЗЫ С НУКЛЕОТИДАМИ

Карнейский М. Я., Яковлев Г. И.

Институт молекулярной биологии Академии наук СССР, Москва:

*Институт биохимии и физиологии микроорганизмов
Академии наук СССР, Пушкино*

Методом ядерного эффекта Оверхаузера (ЯЭО) проведено изучение конформации цитидин-3'-фосфата и цитидин-2'-фосфата в комплексах с рибонуклеазой А. Найдено, что гликозидный торсионный угол φ_{CN} для Cyd-3'-P в комплексе равен 330° . Для Cyd-2'-P в комплексе угол φ_{CN} не локализован, однако значения $70-180^\circ$ исключаются. Показано, что имидазольные циклы остатков His-12 и His-119 в комплексах теряют конформационную подвижность и относительно жестко фиксируются в активном центре. Оценено расстояние между C2-N His-12 и протоном 1'-H нуклеотида. Для комплексов Cyd-3' и 2'-P оно равно 3,6 и 3,3 Å соответственно. Результаты сопоставляются с трехмерной структурой комплексов нуклеотидов с рибонуклеазой S в кристалле.

Метод ядерного эффекта Оверхаузера (ЯЭО) с успехом используется для изучения конформации легких молекул в растворах [1—6]. Качественное применение ЯЭО при исследовании высокомолекулярных соединений продемонстрировано при исследовании взаимодействия пептидов с нейрофизином [7—9]. В настоящей работе изучены конформации нуклеотидов цитидин-3'-фосфата Cyd-3'-P и цитидин-2'-фосфата Cyd-2'-P в комплексах с рибонуклеазой А (РНКаза А) методом ЯЭО с количественной интерпретацией результатов. С помощью этого же метода проведена оценка расстояний между отдельными группами активного центра и фрагментами молекулы нуклеотида в комплексе нуклеотид—фермент.

При количественной интерпретации ЯЭО использованы уравнения для многоспиновой системы, полученные обобщением уравнений для системы двух спинов [10, 11] в приближении парной аддитивности диполь-дипольных взаимодействий [12, 13]:

$$f_i(s) = \sum_{s \neq i} \frac{\sigma_{is}}{R_i} \frac{(M_0)_s}{(M_0)_i} - \sum_{j \neq s, i} \frac{\sigma_{ij}}{R_i} \frac{(M_0)_j}{(M_0)_s} f_j(s), \quad (1)$$

где $f_i(s)$ — величина ЯЭО, определяемая как относительное изменение продольной ядерной намагниченности $(M_z)_i$ при $(M_z)_s = 0$:

$$f_i(s) = \frac{(M_z)_i - (M_0)_i}{(M_0)_i}, \quad (2)$$

$(M_0)_i$, $(M_0)_s$, $(M_0)_j$ — статическая продольная намагниченность i -, s - и j -ядер,

$$R_i = \sum_k \rho_{ik} + \rho_i^*$$

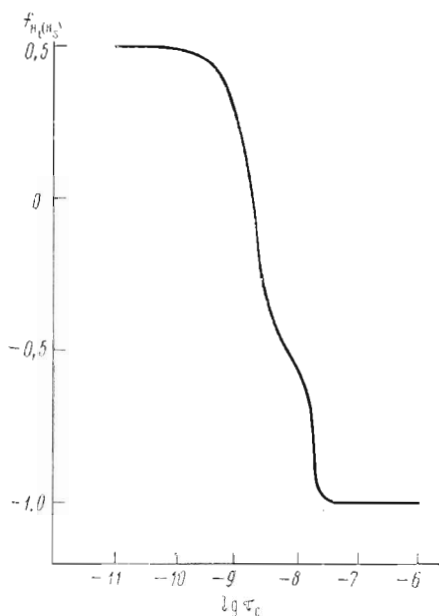


Рис. 1. Зависимость максимальной величины ЯЭО для двух протонов $f_{H_i}(H_s)_{\max}$ от τ_c при $\omega/2\pi = 100$ МГц (рассчитано согласно выражениям для ЯЭО из [11])

движениями разных пар спинов, обусловленную движением молекулы как твердого тела [14]. Хотя молекулярное движение ряда низкомолекулярных белков, в том числе РНКазы А, характеризуется изотропной вращательной диффузией [15, 16], анизотропия подвижности отдельных фрагментов макромолекул может быть обусловлена внутримолекулярным вращением. Рассмотрение релаксации ядерной намагниченности для фрагментов макромолекул в этом случае дано в [17, 18]. Величина ЯЭО зависит от рабочей частоты спектрометра ЯМР и времени корреляции τ_c , поскольку σ и ρ — функции этих параметров [11]. Зависимость $f_i(s)$ для двух неэквивалентных протонов при $\omega/2\pi = 100$ МГц показана на рис. 1. Величина $f_i(s)$ изменяется от 0,5 при $\omega^2\tau_c^2 \ll 1$ до $-1,0$ при $\omega^2\tau_c^2 \gg 1$. Отрицательные значения ЯЭО наблюдаются при $\omega^2\tau_c^2 > 1,25$, что соответствует $\tau_c > 1,8 \cdot 10^{-9}$ с. Такие значения времен корреляции характерны для растворов белков [15, 16, 19].

Для протонов $\omega^2\tau_c^2 \gg 1$ уравнение (1) с подстановкой величин σ и ρ преобразуется к виду

$$f_i(s) = - \sum_{s \neq i} \frac{r_{is}^{-6}}{R_i} + \sum_{j \neq s, i} \frac{r_{ij}^{-6}}{R_i} f_j(s), \quad (3)$$

где

$$R_i \approx \sum_k r_{ik}^{-6}.$$

Уравнение (3) эквивалентно уравнениям для химического обмена [20]. Как и в случае химического обмена, насыщение линии, соответствующей одному из типов обменивающихся ядер, приводит к уменьшению интенсивностей линий других ядер, т. е. в случае $\omega^2\tau_c^2 \gg 1$ для любых i и s величина ЯЭО $f_i(s) < 0$. Второй член в правой части уравнения (3) совпадает по знаку с первым членом. В случае крайнего сужения ($\omega^2\tau_c^2 \ll 1$) знак $f_i(s)$ может определяться этим членом [12, 13]. Таким образом, для белков и связанных с ними в комплексы низкомолекулярных соединений ЯЭО

σ_{ik} и ρ_{ik} — релаксационные параметры i -ядер, определяемые их диполь-дипольным взаимодействием с k -ядрами окружения [11]; ρ^* — вклад межмолекулярного взаимодействия в релаксацию i -спинов. Сравнение экспериментальных значений $f_i(s)$ и рассчитанных согласно уравнению (1) для заданного расположения ядер позволяет делать выбор реализующейся конформации.

Совпадение экспериментальных и рассчитанных величин ЯЭО для протонов 2',3'-изопропилиден-3',5'-циклогуанозина показало практическую применимость приближения парной аддитивности для многоспиновых систем [12]. Следует, однако, заметить, что использование парной аддитивности спин-спинового взаимодействия при описании поведения ядерной намагниченности в многоспиновых системах, вероятно, справедливо лишь для молекул с изотропной вращательной подвижностью, так как в этом случае можно не учитывать корреляции между относительными

Величины ЯЭО, измеренные для растворов рибонуклеазы А и ее комплексов с Cyd-3'- и 2'-Р в D₂O (0,2 М NaCl) при 32° и рН 5,5 *

Соединение	$f_{1'-H(6-H)}$	$ f_{C2-H \text{ His-12}}^{**} $ (Ar)	$f_{C2-H \text{ His-12}}$ (1'-H)	$f_{C2-H \text{ His-119}}^{**}$ (Ar)	$ f_{C2-H \text{ His-119}} $ (1'-H)
Рибонуклеаза А	--	<0,02	—	$ f < 0,02$	--
Рибонуклеаза А + Cyd-3'-Р	$-0,06 \pm 0,02$	<0,02	$-0,08 \pm 0,02$	$-0,05 \pm 0,02^{***}$	<0,02
Рибонуклеаза А + Cyd-2'-Р	$-0,25 \pm 0,02$	<0,02	$-0,13 \pm 0,02$	$ f < 0,02$	<0,02

* Значения $f_{5-H(Ar)}$ и $f_{6-H(Ar)} < 0,02$.

** Ar — все линии ароматической области спектра ЯМР рибонуклеазы А.

*** ЯЭО наблюдался при насыщении линии с химическим сдвигом 6,96 м.д.

протонов жестко фиксированных групп должен иметь отрицательное значение.

В спектре ЯМР в области от 7 до 9 м. д. (δ) лежат сигналы протонов ароматических и амидных протонов белка. При образовании комплексов РНКазы А с нуклеотидами в эту же область спектра попадают сигналы протонов пиримидинового основания и протона 1'-Н рибозного остатка [23]. Эти сигналы не перекрываются с сигналами протонов самого белка, что позволило провести измерения величин ЯЭО. Для повышения точности ЯЭО измеряли методом ИНДОР [24, 22].

Для определения расстояния между протонами нуклеотида 1'-Н и 6-Н, зависящего от конформации нуклеотида, измерялся ЯЭО для протонов 1'-Н при насыщении линии протонов 6-Н комплексов Cyd-3'-Р и Cyd-2'-Р с рибонуклеазой А.

Для оценки расстояний между некоторыми группами активного центра, между этими группами и фрагментами молекулы нуклеотида в комплексе измерялся ЯЭО для протонов С2-Н гистидиновых остатков, протонов 1'-Н, 5-Н и 6-Н нуклеотида при насыщении линий сигналов остальных протонов ароматической области спектра.

Из рис. 2 и 3 и данных таблицы видно, что как для протонов нуклеотида в комплексе с РНКазой А, так и для протонов белка ЯЭО имеет отрицательный знак. Следовательно, времена корреляции для протонов нуклеотида в комплексе РНКазы с Cyd-2'(3')-Р должны находиться в области значений, характерных для протонов самой РНКазы, определяемых вращательной подвижностью молекулы белка ($\tau_c \sim 3 \cdot 10^{-8}$ с). Таким образом, можно полагать, что нуклеотид в комплексе с РНКазой А жестко фиксирован в активном центре фермента. Однако недавно появилось сообщение, в котором на основе анализа изменения времени ядерной магнитной релаксации протонов нуклеотида при связывании его с РНКазой А авторы пришли к выводу, что в комплексе рибозное кольцо Cyd-3'-Р жестко фиксировано и имеет время корреляции такое же, как и сам белок, тогда как основание нуклеотида обладает значительной подвижностью [25]. Расчет τ_c проведен авторами на основании выражения для случая, когда $\omega^2 \tau_c^2 \ll 1$ [26]:

$$(\Delta\nu_{1/2})_{E1} = \frac{1}{\pi T_2} = \frac{c\tau_c}{\pi} \sum_i r_i^{-6}, \quad (4)$$

где τ_c — время корреляции диполь-дипольного взаимодействия; r_i — расстояния от протона, ширина линии которого рассчитывается до всех близлежащих протонов в Å; $c = 8,85 \cdot 10^{11}$; $(\Delta\nu_{1/2})_{E1}$ — ширина сигнала ПМР (на полувысоте) протонов нуклеотида, находящегося в комплексе с ферментом. Поскольку τ_c для протонов нуклеотида в комплексе могут

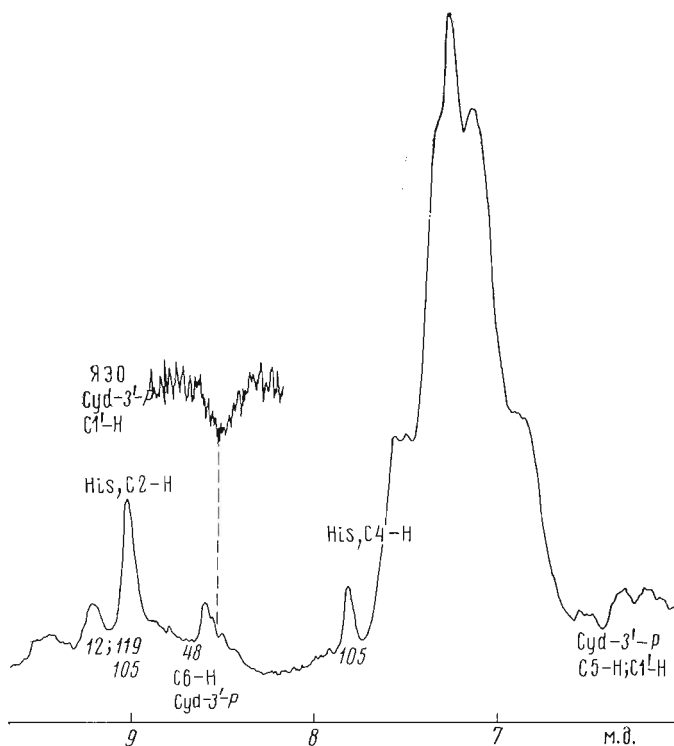


Рис. 2. ЯМР- и ЯЭО-спектры комплекса РНКазы А с Cyt-3'-P (ароматическая область), использовавшиеся при определении конформации нуклеотида в комплексе. Молярное отношение нуклеотид/белок — 0,95 : 1; рD = 5,5; t 32°

иметь значения, близкие к $3 \cdot 10^{-8}$ с, что дает при $\omega/2\pi = 90$ МГц [25] значение величины $\omega^2\tau_c^2 \approx 287$, следует при расчетах τ_c использовать более общее выражение [27]:

$$\frac{1}{T_2} = \frac{\gamma^4 \hbar^2}{20} \sum_i \frac{\tau_{ci}}{r_i^6} \left[9 + \frac{15}{1 + \omega^2\tau_{ci}^2} + \frac{6}{1 + 4\omega^2\tau_{ci}^2} \right]. \quad (5)$$

Выражение (4) получается из (5) при $\omega^2\tau_c^2 \ll 1$ и использовании единого времени корреляции τ_c . Применение выражения (4) для определения τ_c при $\omega^2\tau_c^2 \gg 1$ приводит, как видно из сравнения его с выражением (5), к заниженному значению. Используя для расчетов τ_c выражение (5) и экспериментальные значения $(\Delta\nu_{1/2})_{\text{БП}}$, найденные в [25], мы получили для протонов основания нуклеотида в комплексе с белком $\tau_c = (3 \pm 1) \cdot 10^{-8}$, а для C1'-H рибозного кольца — $(8 \pm 2) \cdot 10^{-8}$ с. При расчете τ_c на основании выражения (4) аналогичные величины имеют значения $4,4 \cdot 10^{-9}$ и $1,2 \cdot 10^{-8}$ соответственно. Величина τ_c для 1'-H-протона рибозного кольца, полученная нами, заметно превышает максимально возможное значение для комплекса, определяемое вращательной подвижностью самого белка ($\tau_c \approx 3 \cdot 10^{-8}$ с). Следовательно, в расчете необходимо учитывать диполь-дипольное взаимодействие рибозного кольца с протонами белка, поскольку другие возможные механизмы уширения линии 1'-H под влиянием белка малоэффективны.

Мы провели расчет τ_c для 1'-H₂ рибозного кольца Cyt-3'-P в комплексе с РНКазой А в предположении, что два Н-атома белка, расположенные на расстоянии ван-дер-ваальсовых контактов (2,4 Å) от атома 1'-H₂ рибозного кольца, влияют на его релаксацию, и получили $\tau_c = (1,3 \pm 0,3) \cdot 10^{-8}$ с.

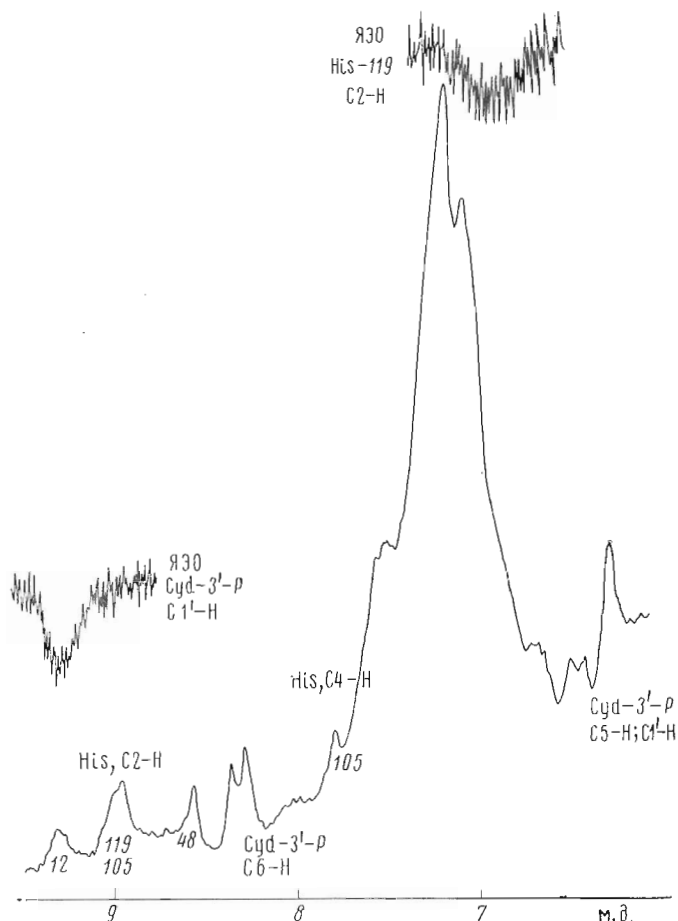


Рис. 3. ЯМР- и ЯЭО-спектры комплекса рибонуклеазы А с Cyt-3'-P (ароматическая область), использованные при определении расстояний между группами активного центра фермента. Молярное отношение нуклеотид/белок — 2 : 1; $\rho D = 5,5$; $t 32^\circ$

Таким образом, можно заключить, что гетероциклическое основание и рибозное кольцо нуклеотида в комплексе Cyt-3'-P с РНКазой А жестко связаны с белком.

Для определения конформации нуклеотидов в комплексе РНКазы А с Cyt-3'(2')-P, характеризуемой торсионным углом φ_{C-N} , на основании экспериментальных значений ЯЭО выполнены расчеты f_{C-H} (6-H) в зависимости от угла φ_{C-N} из уравнения (3). Правомомерность использования уравнения (3) определялась тем, что измерения проводились при $\omega^2 \tau_c^2 \gg 1$. Расчеты f_{C-H} (6-H) выполнены для модели с 3'-эндо-конформацией рибозы, которая характерна для комплекса Cyt-3'-P с рибонуклеазой в кристалле [28]. Для нахождения межатоомных расстояний при различных гликозидных углах φ_{C-N} использовались данные по молекулярной геометрии Cyt-2'(3')-P в кристаллическом состоянии [29]. Значения f_{C-H} (6-H), рассчитанные для модели с плоским рибозным циклом [30] и с 3'-эндо-конформацией рибозы, практически не различались. Сравнение экспериментальной величины f_{C-H} (6-H) для комплекса Cyt-3'-P с РНКазой А с теоретически рассчитанными (рис. 4) показывает, что для любых значений φ_{C-N} нет соответствия между экспериментальными и теоретическими

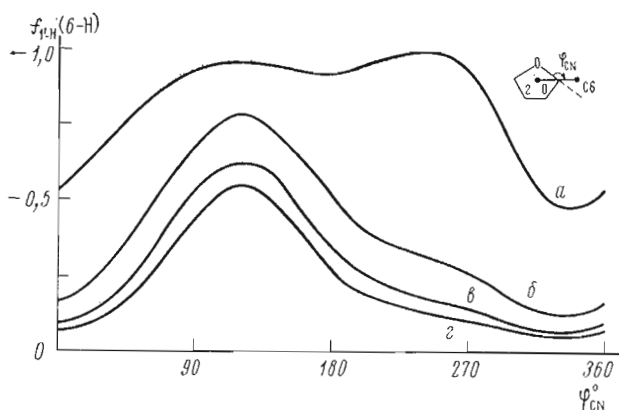


Рис. 4. Теоретическая зависимость величины ЯЭО для протонов нуклеотидов в комплексе с белком $f_{1'-H}(6-H)$ от величины торсионного угла φ_{CN} при $\tau = 3 \cdot 10^{-8}$ с. *a* — протон $1'-H$ нуклеотида не испытывает дипольного взаимодействия с протонами белка; *b* — протон $1'-H$ взаимодействует с одним из протонов белка, находящимся на расстоянии 2,4 Å; *c* — то же с двумя протонами белка; *z* — то же с тремя протонами белка

величинами $f_{1'-H}(6-H)$, если не учитывать взаимодействие между протонами $1'-H$ нуклеотида и протонами белка (рис. 4, *a*). Следовательно, вблизи протонов $1'-H$ нуклеотида находятся протоны белка, влияющие на скорость релаксации $1'-H$ -протонов. Очевидно, возможные вклады в релаксацию $1'-H$ за счет квадрупольного момента азота или анизотропии химической связи карбонильных групп белка пренебрежимо малы.

Для комплекса РНКазы А с Cyd-3'-P соответствие между экспериментальными и теоретическими значениями $f_{1'-H}(6-H)$ достигается при $\varphi_{CN} 330 \pm 25^\circ$ для случая, когда теоретическое значение рассчитано с учетом взаимодействия между $1'-H$ и двумя протонами белка (рис. 4). При этом принималось, что между протонами белка и протоном нуклеотида ($1'-H$) реализуется ван-дер-ваальсово взаимодействие и равновесное расстояние составляет 2,4 Å.

Таким образом, можно считать установленным, что Cyd-3'-P в комплексе с РНКазой А в растворе фиксирован в *анти*-конформации.

Для комплекса РНКазы А с Cyd-2'-P соответствие между экспериментальными и теоретически рассчитанными значениями $f_{1'-H}(6-H)$ также осуществляется только в случае, если учитываются возможные релаксационные вклады протонов белка (рис. 4). При этом оказывается, что соответствие реализуется в широком интервале значений, характерном для *анти*-конформации (от 180 до 70°). Поскольку экспериментально определенное значение $f_{1'-H}(6-H)$ для комплекса РНКазы А с Cyd-2'-P существенно больше, чем для комплекса с Cyd-3'-P, это может означать, что различны либо конформация нуклеотидов в комплексе, либо величина релаксационного вклада протонов белка. К сожалению, имеющиеся в настоящее время экспериментальные данные не позволяют однозначно выбрать между этими возможностями и тем самым определить более точно конформацию Cyd-2'-P в комплексе с РНКазой А.

Оценку расстояний между протонами нуклеотида и белка или протонами отдельных групп белка в комплексе нуклеотид — РНКазы А мы провели, используя метод ЯЭО и данные по спин-решеточной релаксации протонов (T_1) His-12 и His-119 РНКазы А [31]. Представляет интерес определение расстояния между C2-H имидазольного цикла His-12 и $1'-H$ нуклеотида в комплексе Cyd-3'-P с рибонуклеазой. Величина ЯЭО для C2-H His-12 при насыщении линии протонов $1'-H$ в соответствии с урав-

нением (3) равна:

$$f_{C2-H}(1'-H) = - \sum_k r_k^{-6} \left[r_{C2-H-1'-H}^{-6} - \sum_j r_{C2-H-j-H}^{-6} f_{j-H}(1'-H) \right].$$

Вклад второго члена в квадратных скобках несуществен, если между C2-H и His-12 и 1'-H нуклеотида не расположен какой-либо третий протон. Рассмотрение структуры комплекса РНКазы А с Cyd-3'-P в найденной нами конформации на молекулярной модели показало, что вблизи указанных протонов нет группы, протоны которой могли бы расположиться между интересующими нас протонами. Поэтому экспериментальное значение $f_{C2-H}(1'-H)$ отражает непосредственное взаимодействие протонов C2-H His-12 и 1'-H нуклеотида в комплексе. Величина $\sum_k r_k^{-6}$ может быть определена из выражения (6), если известно значение T_1 для протонов C2-H His-12 [32]:

$$\frac{1}{T_1} = \frac{3}{10} \gamma^4 \hbar^2 \sum_k r_k^{-6} \left(\frac{\tau_c}{1 + \omega^2 \tau_c^2} + \frac{4\tau_c}{1 + 4\omega^2 \tau_c^2} \right). \quad (6)$$

Используя результаты измерений T_1 протонов C2-H гистидиновых остатков комплекса РНКазы А с Cyd-3'-P [31], с учетом корректного отнесения сигналов протонов His-12 и His-119 [33] и $\tau_c = 3 \cdot 10^{-8}$ с, мы нашли, что $\sum_k r_k^{-6} = 0,006$ и $r_{C2-H-1'-H} \approx 3,6 \text{ \AA}$.

Аналогичный расчет для комплекса Cyd-2'-P с РНКазой А требует определения соответствующего значения T_1 этого комплекса. Как видно из [31], связывание РНКазы с Cyd-3'-P изменяет время релаксации T_1 протонов имидазольного кольца His-12 на $\sim 25\%$. Можно предположить, что образование комплекса с Cyd-2'-P оказывает такое же влияние на величину T_1 C2-H His-12. Это предположение кажется тем более оправданным, что ошибка в принятом значении T_1 даже в 100% приводит к ошибке расчета межатоминого расстояния $\sim 12\%$. Приняв T_1 C2-H His-12 в комплексе РНКазы А с 2'-СМР равным соответствующему значению T_1 для комплекса с 3'-СМР, нашли, что $r_{C2-H-1'-H} \approx 3,3 \text{ \AA}$.

Из таблицы видно, что для комплекса Cyd-3'-P с РНКазой наблюдается заметный ЯЭО между C2-H His-119 и протонами некоторого ароматического аминокислотного остатка фермента. Оценка расстояния способом, аналогичным вышеизложенному, с использованием значения $T_1 = 0,38$ с для C2-H His-119 (расчет этого значения из данных работы [31] приведен ниже) дает значение $r_{C2-H-X-H} \approx 4,0 \text{ \AA}$. Исследование молекулярной модели комплекса Cyd-3'-P с РНКазой S показало, что протон, взаимодействующий с C2-H His-119, может принадлежать ароматическому кольцу остатка Phe-8 или Phe-120.

Дополнительным подтверждением того, что боковая цепь His-119 ограничивается в конформационной подвижности в комплексе с Cyd-3'-P, могло бы служить увеличение T_1 C2-H His-119 в комплексе по сравнению с его значением в свободной РНКазе. Однако линии протонов C2-H His-119 (в [31] His-12) и C2-H His-105 в комплексе при pH 5,5 перекрываются, и в [31] приведена величина T_1 для суммарной намагниченности этих протонов. Для способа измерения T_1 , использованного в [31], можно записать:

$$\left[1 - 2 \exp \left(- \frac{t}{T_1^{105}} \right) \right] + \left[1 - 2 \exp \left(- \frac{t}{T_1^{119}} \right) \right] = 0 \quad \text{при } t = T_1^{\text{сум}} \ln 2,$$

где T_1^{105} — время спин-решеточной релаксации протонов C2-H His-105; T_1^{119} — время спин-решеточной релаксации протонов C2-H His-119; $T_1^{\text{сум}}$ — величина T_1 для суммарного сигнала протонов C2-H His-105 и His-119.

Следует ожидать, что величина T_1 для протонов C2-H His-105 в комплексе с Cud-3'-P и в свободном белке одинакова, так как His-105 удален от центра связывания нуклеотида, а возможное увеличение его подвижности исключается совпадением в обоих случаях величины T_1 для протонов C4-H.

Приняв значение T_1^{105} для комплекса равным значению для свободной РНКазы, найдем, что в комплексе $T_1^{119} = 0,38$, а в свободном ферменте 0,28 с [34]. Увеличение T_1^{119} в комплексе с Cud-3'-P при $\omega^2\tau_c^2 \gg 1$ свидетельствует об увеличении τ_c или ограничении пребывания в конформационных состояниях с более плотным протонным окружением, т. е. об ограничении конформационной подвижности боковой цепи His-119 при образовании комплекса нуклеотид—фермент.

Представляет интерес рассмотреть полученные нами результаты с использованием данных трехмерной структуры РНКазы S* и ее комплексов с нуклеотидами в кристалле [28]. Такое сопоставление правомерно, поскольку различия в трехмерной структуре этих белков локализованы на периферии молекулы и не затрагивают области активного центра [24, 34]. Первое, что необходимо отметить, — это совпадение конформации Cud-3'-P, связанного в активном центре фермента, в кристаллическом состоянии и в растворе. В обоих случаях нуклеотид находится в *anti*-конформации, характеризующейся углом $\varphi_{CN} \sim 330^\circ$. Поскольку в РНКазе имеется только один центр, обладающий высоким сродством к пиримидиновым нуклеотидам, можно думать, что «архитектура» этого участка активного центра практически не меняется при кристаллизации фермента. Подтверждением этого вывода служит тот факт, что в растворе, как и в кристалле, группа C2-H, His-12 РНКазы в комплексе с Cud-3'-P обличена с 1'-H рибозного фрагмента молекулы нуклеотида. Сделанное нами предположение о влиянии протонов белка на скорость релаксации протонов 1'-H нуклеотида в комплексе РНКазы А с Cud-3'-P хорошо согласуется с данными рентгеноструктурного анализа комплекса, по которым боковая цепь Val-43 и C2-H и группы NH имидазольного цикла His-12 РНКазы S находятся в непосредственной близости к C1'-H нуклеотида.

Из молекулярной структуры РНКазы S видно, что His-12 и His-119 расположены в окружении протонсодержащих групп (экранированные группы NH полипептидной цепи, боковые цепи остатков Phe-8, Phe-120 и Phe-46 и т. д.), которые могли бы влиять на релаксацию протонов C2-H имидазольных колец этих остатков. Однако ни в одном из опытов нам не удалось зарегистрировать ЯЭО для C2-H His-12 или His-119. Следовательно, имидазольные циклы His-12 и His-119 в свободном ферменте обладают подвижностью, превышающей молекулярную подвижность самого белка. В комплексе РНКазы с Cud-3'-P оба имидазольных кольца теряют конформационную подвижность и относительно жестко фиксируются в активном центре. Полученные результаты экспериментально подтверждают гипотезу, что одним из факторов, определяющих эффективность ферментов как катализаторов, является иммобилизация компонентов в фермент-субстратном комплексе в основном состоянии [36].

Экспериментальная часть

В работе использовали хроматографически чистые образцы цитидин-2'-фосфата, цитидин-3'-фосфата и рибонуклеазы А.

Нуклеотиды растворяли в D₂O (98,8%) в концентрации ~1% и через 5 мин лиофильно высушивали, в дальнейшем использовали приготовленные таким образом образцы. Подвижные протоны РНКазы А также предпочтительно обменивали на дейтерий. Для этого образец растворяли в D₂O

* РНКазы S — белок, полученный расщеплением пептидной связи РНКазы А между 20-м и 21-м аминокислотными остатками. РНКазы S по кинетическим свойствам практически не отличается от РНКазы А [35].

в концентрации $\sim 0,2\%$, раствор выдерживали при $pD = 3,5$ и 30° в течение 2 сут. В дальнейшем использовали лиофильно высушенный из этого раствора препарат РНКазы. Образцы для анализа методом ЯМР приготавливали в виде $0,01$ М растворов в D_2O . Ионная сила растворов задавалась $0,2$ М концентрацией $NaCl$. Значение pD устанавливали добавлением DCI и $NaOD$. pH измеряли непосредственно в ампулах с образцами с помощью специально изготовленных микроэлектродов на pH -метре ЛПУ-01. После измерения pH ампулы герметизировали. В качестве внешнего стандарта использовали гексаметилдисилаксан. Спектры ЯМР измеряли на спектрометре HA-100 D (Varian). Измерения ЯЭО проводили по методике, описанной в [21, 22]. Отношение сигнал/шум в случае необходимости повышали с помощью накопителя спектров C-1024 (Varian).

Эксперименты по ЯЭО с целью определения конформации нуклеотидов в комплексе проводили на образцах с молярным отношением нуклеотид/белок $0,95 : 1$. Поскольку константы диссоциации комплекса РНКазы А с $Cyd-3'$ - и $Cyd-2'$ -P соответственно равны $83 \cdot 10^{-6}$ и $5,5 \cdot 10^{-6}$ [37], концентрация свободного нуклеотида не превышала 5% . Эксперименты по ЯЭО во всех остальных случаях проводили на образцах с отношением нуклеотид/белок $2 : 1$ при концентрации свободного фермента $< 1\%$. В приведенных значениях pD поправка на изотопный эффект не вводилась.

ЛИТЕРАТУРА

1. Noggle J. H., Schirmer R. E. (1971) The Nuclear Overhauser Effect. Chemical Applications, Acad. Press, N. Y.
2. Schirmer R. E., Davis J. P. (1972) J. Amer. Chem. Soc., **94**, 2561—2572.
3. Hart P. A., Davis J. P. (1972) J. Amer. Chem. Soc., **94**, 2572—2577.
4. Davis J. P. (1972) Tetrahedron, **28**, 1155—1165.
5. Son T.-D., Guschelbauer W., Gueron M. (1972) J. Amer. Chem. Soc., **94**, 7903 — 7911.
6. Son T.-D., Chachaty C. (1973) Biochim. et biophys. acta, **335**, 1—13.
7. Balaram P., Bothner-By A. A., Dadok J. (1972) J. Amer. Chem. Soc., **94**, 4015—4017.
8. Balaram P., Bothner-By A. A., Breslow E. (1972) J. Amer. Chem. Soc., **94**, 4017 — 4018.
9. Balaram P., Bothner-By A. A., Breslow E. (1973) Biochemistry, **12**, 4695—4704.
10. Solomon I. (1955) Phys. Rev. **99**, 559—564.
11. Абрагам А. (1963) Ядерный магнетизм, с. 310, Изд-во иностр. лит., М.
12. Schirmer R. E., Noggle J. H., Davis J. P., Hart P. A. (1970) J. Amer. Chem. Soc., **92**, 3266—3273.
13. Brownstein S., Bystrov V. (1970) Can. J. Chem., **48**, 243—256.
14. Hubbard P. S. (1969) J. Chem. Phys., **51**, 1647—1651.
15. Yquerabide J., Epstein H. F., Stryer L. (1970) J. Mol. Biol., **51**, 573—590.
16. Young D. M., Potts J. T. (1963) J. Biol. Chem., **238**, 1995—2002.
17. Marahall A. G., Schmidt P. G., Sykes B. D. (1972) Biochemistry, **11**, 3875—3883.
18. Werbelow L. G., Marahall A. G. (1973) J. Amer. Chem. Soc., **95**, 5132—5134.
19. Allerhand A., Doddrell D., Glushko V., Cochran D. W., Wenkert E., Lawson P. J., Gurd F. R. N. (1971) J. Amer. Chem. Soc., **93**, 544—546.
20. Hoffman R. A., Forsen S. (1966) J. Chem. Phys., **45**, 2049—2066.
21. Tumanyan V. G., Mamaeva O. K., Bocharov A. L., Ivanov V. I., Karpetsky M. Ya., Yakovlev G. I. (1974) Eur. J. Biochem., **50**, 119—127.
22. Карпейский М. Я., Яковлев Г. И. (1975) Биоорганическая химия, **1**, 749—757.
23. Medows D. H., Jardetzky O. (1968) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **61**, 406—413.
24. Richards F. M., Wyckoff H. W. (1973) Ribonuclease S. In Atlas of Molecular Structures in Biology (Phillips D. C., Richards F. M., eds.), Clarendon Press, Oxford.
25. Gorenstein D. G., Wyrwicz A. M. (1974) Biochem. and Biophys. Res. Commun., **59**, 718—724.
26. Jardetzky O. (1964) Advances Chem. Phys., **7**, 499—531.
27. Абрагам А. (1963) Ядерный магнетизм, с. 273, Изд-во иностр. лит., М.
28. Richards F. M., Wyckoff H. W. (1970) The Enzymes, **4**, 647—806.
29. Furberg S., Peterson C. S., Pomming C. (1965) Acta crystallogr., **18**, 313—321.
30. Colter C. L. (1973) J. Amer. Chem. Soc., **95**, 570—575.
31. Benz F. W., Roberts G. C. K., Feeney J., Ison R. R. (1972) Biochim. et biophys. acta, **278**, 233—238.
32. Абрагам А. (1963) Ядерный магнетизм, с. 272, Изд-во иностр. лит., М.
33. Дудкин С. М., Карпейский М. Я., Сахаровский В. Г., Яковлев Г. И. (1975) Докл. АН СССР, **221**, 740—743.

34. Carlisle C. H., Palmer R. A., Mazumdar S. K., Gorinsky B. A., Yeates D. G. R. (1974) *J. Mol. Biol.*, 85, 1—18.
35. Richards F. M., Vithayathil P. J. (1959) *J. Biol. Chem.*, 234, 1459—1469.
36. Ivanov V. I., Karpeisky M. Ya. (1969) *Adv. Enzymol.*, 32, 21—53.
37. Anderson D. G., Hammes G. C., Walz F. G. (1968) *Biochemistry*, 7, 1637—1642.

Поступила в редакцию
20.III.1976

APPLICATION OF NUCLEAR OVERHAUSER EFFECT FOR INVESTIGATION OF THE STRUCTURE OF RIBONUCLEASE-NUCLEOTIDE COMPLEXES

KARPEISKY M. Ya., YAKOVLEV G. I.

*Institute of Molecular Biology, Academy of Sciences of the USSR,
Moscow; Institute of Biochemistry and Physiology
of Microorganisms, Academy of Sciences of the USSR, Pushchino*

A study has been made of cytidine 3'-phosphate(3'-CMP) and cytidine 2'-phosphate (2'-CMP) complexes with ribonuclease A using nuclear Overhauser effect measurements. The cytosine-ribose torsion angle (φ_{CN}) of -30° was found for 3'-CMP-enzyme complex. Though φ_{CN} of 2'-CMP bound to the enzyme was not determined precisely, the range of syn conformations ($70-180^\circ$) was ruled out. The conformational mobility of His-12 and His-119 imidazole rings was demonstrated to be decreased in complexes as compared to free enzyme. The internuclear distances between His-12 C2-H and nucleotide H-1' protons were calculated for the nucleotide-enzyme complexes.
