



УДК 577.155

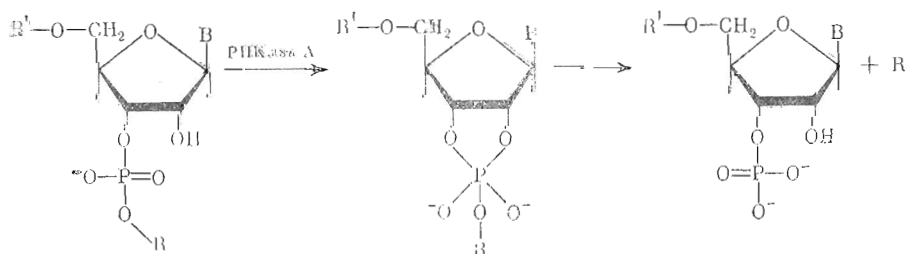
ТЕРМОДИНАМИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ СВЯЗЫВАНИЯ РИБОНУКЛЕАЗЫ А С АНАЛОГАМИ СУБСТРАТОВ

*Антонов И. В., Дудкин С. М., Карнейский М. Я.,
Илатонов А. Л., Протасевич И. И., Яковлев Г. И.,
Чернавский Д. С.*

*Институт молекулярной биологии Академии наук СССР, Москва;
Физический институт Академии наук СССР, Москва*

Методом дифференциальной микрокалориметрии измерены теплоты комплексообразования (Q) и константы ассоциации ($K_{асс}$) рибонуклеазы А с различными аналогами динуклеозидфосфатов и нуклеотидов при 25°, рН 5,5 и ионной силе 0,2. На основании полученных данных рассчитаны значения стандартных термодинамических параметров связывания: ΔH° , ΔG° , ΔS° . Показано, что связывание «неузнаваемых» фрагментов субстрата — динуклеозидфосфата (рибозного кольца и уходящей группы) увеличивает внутреннюю энергию фермент-субстратного комплекса, которая может быть затрачена на катализ. Результаты работы находятся в соответствии с гипотезой об определяющем значении многоточечных контактов в активных центрах ферментов для оптимизации катализа.

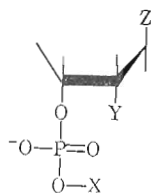
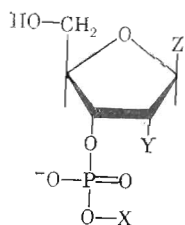
РНКаза А катализирует расщепление межнуклеотидных фосфодиэфирных связей в РНК — реакцию трансэтерификации [1]. При этом постулируется, что в качестве промежуточного соединения реакции образуется пятиковалентное соединение фосфора [2, 3] (схема).



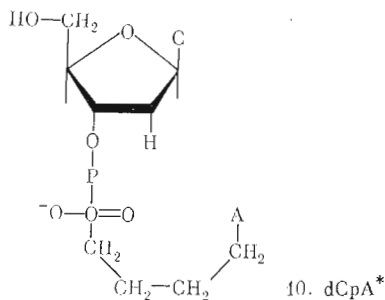
Скорость реакции зависит от строения гетероциклического основания и гликозидного фрагмента как 3'-, так и 5'-нуклеозидных остатков субстратов [4—13]. При этом, если изменение структуры гетероциклического основания в 3'-фрагменте субстратов сказывается и на их связывании с ферментом, и на скорости реакции, изменение строения гликозидных остатков обоих фрагментов влияет практически только на число оборотов реакции [5, 6]. Изменение структуры гетероцикла в 5'-фрагменте субстрата также отражается только на скорости катализируемой реакции и практически не оказывает влияния на образование фермент-субстратного комплекса [7].

В настоящее время принято считать, что одним из основных энергетических источников, обеспечивающих высокие скорости реакций, катализируемых ферментами, является энергия образования фермент-субстратного комплекса [8]. Одним из эффективных подходов к изучению энергетики белок-лигандного взаимодействия служит получение равновесных термодинамических параметров комплексообразования. Исследование связывания фермента с аналогами субстрата, незначительно отличающимися от последнего по структуре и конформации, позволяет оценить вклад энергии связывания отдельных фрагментов молекулы субстрата в общее изменение энергии системы.

Настоящая работа посвящена изучению взаимодействия различных аналогов и производных нуклеотидов и динуклеозидфосфатов с РНКазой А с целью выявить вклад «неузнаваемых» фрагментов субстрата — рибозного кольца, фосфодиэфирной группы, уходящей группы — в энергетику образования продуктивного фермент-субстратного комплекса (см. структуру исследованных лигандов:



1. 3-CMP (X = H, Y = OH, Z = Cyt)
2. 3-UMP (X = H, Y = OH, Z = Ura)
3. 2-F-3-UMP (X = H, Y = F, Z = Ura)
4. dCpA (X = Ade, Y = H, Z = Cyt)
5. 2-F-dUpA (X = Ade, Y = F, Z = Ura)
6. 2-F-dUMP-OMe (X = Me, Y = F, Z = Ura)
7. 3-C*MP (X = H, Y = H, Z = Cyt)
8. 3-C**MP (X = H, Y = OH, Z = Cyt)
9. C*pA (X = Ade, Y = H, Z = Cyt)



При исследовании комплексообразования РНКазы А с нуклеотидами мы использовали метод дифференциальной микрокалориметрии. Преимущество этого метода перед широко используемым при изучении комплексообразования нуклеотидов с РНКазой методом разностной спектрофотометрии [9] заключается в том, что при достаточной чувствительности он не несет ограничений, накладываемых высокой оптической плотностью растворов лигандов. Кроме того, дифференциальная микрокалориметрия позволяет непосредственно измерять такой важный термодинамический параметр реакции, как теплоту связывания.

При смешении растворов исследуемых веществ и РНКазы А выделяется тепло Q , которое является суммой теплот разбавления компонентов и теплоты взаимодействия фермента с лигандом. В условиях дифференциаль-

Значения констант ассоциации РНКазы А с лигандами

| Лиганд | $K_{\text{асс}} \cdot 10^{-3}, \text{M}^{-1}$ | Лиганд | $K_{\text{асс}} \cdot 10^{-3}, \text{M}^{-1}$ | Лиганд | $K_{\text{асс}} \cdot 10^{-3}, \text{M}^{-1}$ |
|--------------|---|---------|---|------------------|---|
| 3'-СМР | 26,8 | 3-С**МР | 15,0 | С*рА | 0,7 |
| 3'-УМР | 14,0 | 5'-АМР | 3,0 | 2'-F-dUpA | 2,5 |
| 2'-F-3'-dUMP | 60,0 | dCpA | 0,9 | 2'-F-3'-dUMP-OMe | 3,5 |
| 3'-С*МР | 14,0 | CpA * | 0,7 | | |

Примечание. Константы ассоциации измерены при 25°, рН 5,5 и ионной силе раствора 0,2 (0,1 М ацетат натрия, 0,1 М NaCl).

ного калориметра теплоты разбавления лигандов компенсируются, а величина теплового эффекта разбавления белка при используемых концентрациях лежит ниже пороговой чувствительности прибора. Флогел и др. [10] показали, что Q , $Q_{\text{макс}}$ (теплота ассоциации с 1 моль фермента для всех связывающих центров белка) и $K_{\text{асс}}$ (константа ассоциации) связаны уравнением

$$\frac{1}{Q} = \frac{1}{Q_{\text{макс}}} + \frac{1}{Q_{\text{макс}} K_{\text{асс}} [I]_{\text{своб}}}, \quad (1)$$

где $[I]_{\text{своб}}$ — концентрация несвязанного лиганда, равная

$$[I]_{\text{своб}} = [I]_0 - N \frac{Q}{Q_{\text{макс}}} [E]_0,$$

N — число независимых связывающих центров, которое при используемых концентрациях лигандов и фермента может быть во всех случаях принято равным единице, о чем свидетельствуют данные, полученные методом ядерного магнитного резонанса (ЯМР) при изучении комплексов исследуемых соединений с РНКазой А [11, 12]; $[I]_0$ — исходная концентрация лиганда; $[E]_0$ — исходная концентрация фермента.

Кажущиеся термодинамические параметры связывания могут быть рассчитаны из известных выражений:

$$\Delta G_{\text{каж}} = -RT \ln K_{\text{асс}}, \quad (3)$$

$$\Delta S_{\text{каж}} = (\Delta H_{\text{каж}} - \Delta G_{\text{каж}})/T. \quad (4)$$

Константы ассоциации, полученные при рН 5,5 и ионной силе 0,2, и кажущиеся термодинамические параметры комплексообразования, рассчитанные из экспериментальных данных по формулам 1—4, приведены в табл. 1, 2. Максимальная средняя квадратичная ошибка определения $\Delta H_{\text{каж}}$ составляет ± 1 ккал/моль, а ошибка определения $\Delta G_{\text{каж}} = \pm 0,2$ ккал/моль.

При изучении связывания моно- и дианионных ингибиторов с РНКазой А методом ЯМР было показано, что комплексообразование сопровождается протонированием остатков гистидинов 12, 48 и 119 и нуклеозидфосфаты связываются с ферментом в виде дианионов [12—16]. Более того, как следует из работы [12], диссоциация His¹¹⁹ приводит к распаду комплексов РНКазы А с моно- и дианионными лигандами. Следовательно, экспериментально получаемые значения $\Delta H_{\text{каж}}$ и $\Delta G_{\text{каж}}$ включают в себя как «истинные», рН-независимые термодинамические параметры связывания, так и величины, характеризующие протонирование фермента и депротонирование лиганда. Данные детального калориметрического изучения рН-титрования РНКазы А и рН-зависимости связывания 3'-СМР с ферментом, проведенного в работах [17, 18], хорошо согласуются с такой точкой зрения. Было показано, что протонсвязывающие участки фермента (остатки His¹², His⁴⁸ и His¹¹⁹) термодинамически независимы, а энтальпии протонирования His¹² и His¹¹⁹ одинаковы как в свободной РНКазе А, так и в

Значения кажущихся термодинамических параметров комплексообразования РНКазы А с лигандами

| Лиганд | $\Delta H_{\text{каж}}$ | $\Delta G_{\text{каж}}$ | $\Delta S_{\text{каж}}$, энтр. ед. | Лиганд | $\Delta H_{\text{каж}}$ | $\Delta G_{\text{каж}}$ | $\Delta S_{\text{каж}}$, энтр. ед. |
|--------------|-------------------------|-------------------------|--|------------------|-------------------------|-------------------------|--|
| | ккал/моль | | | | ккал/моль | | |
| 3'-СМР | 10,2 | 6,0 | 14,0 | dCpA | 8,0 | 4,0 | 13,3 |
| 3'-UMP | 7,7 | 6,7 | 7,0 | dCpA* | 8,0 | 3,8 | 14,1 |
| 2'-F-3'-dUMP | 11,4 | 6,5 | 16,5 | C*pA | 10,1 | 3,8 | 21,2 |
| 5'-AMP | 9,8 | 4,7 | 17,1 | 2'-F-dUpA | 7,2 | 4,6 | 8,5 |
| 3'-C*MP | 14,7 | 5,6 | 30,5 | 2'-F-3'-dUMP-OMe | 12,5 | 4,8 | 25,8 |
| 3'-C**MP | 9,2 | 5,6 | 12,0 | | | | |

Примечание. Измерения проводили при 25°, pH 5,5 и ионной силе раствора 0,2 (0,1 М ацетат натрия, 0,1 М NaCl).

ее комплексе с 3'-СМР и составляют $-6,5$ ккал/моль. Теплота протонирования His⁴⁸ в условиях проведения экспериментов (pH 5,5) весьма незначительна и поэтому в дальнейшем при расчетах не учитывалась. То же относится и к энтальпии диссоциации фосфатной группы нуклеотидов, величина которой составляет 0 ± 300 ккал/моль [10].

На основании данных, приведенных выше, в качестве термодинамической модели комплексообразования РНКазы А с нуклеотидами и их эфирами мы рассматривали взаимодействие лигандов с полностью диссоциированной фосфатной группой и фермента, в котором остатки His¹² и His¹¹⁹ полностью протонированы. Тогда в соответствии с результатами, полученными Флотел и др. [17—19],

$$\Delta H_{\text{каж}} = \Delta H^{\circ} + \sum_{j=1}^2 \left(\frac{[H^+]}{K'_j + [H^+]} \Delta H'_{pj} - \frac{[H^+]}{K_j + [H^+]} \Delta H_{pj} \right), \quad (5)$$

$$\Delta G_{\text{каж}} = \Delta G^{\circ} - RT \sum_{j=1}^2 \ln \frac{(K'_j + [H^+])}{(K_j + [H^+])} + RT \ln \left(1 + \frac{[H^+]}{K_{\Phi}} \right), \quad (6)$$

где ΔH° и ΔG° — соответственно изменение энтальпии и свободной энергии при связывании лигандов с протонированной формой фермента; K_j и K'_j — константы диссоциации остатков гистидина в свободном ферменте и в его комплексах; ΔH_p и $\Delta H'_p$ — энтальпия протонирования гистидинов в РНКазе А и в ее комплексах. При расчетах по приведенным формулам для всех дианионных ингибиторов принимали pK_1 равным 1,0, а pK_2 равным 6,0. В случае моноанионных лигандов pK_a остатка фосфата принимался равным 1,0. Величины K_j и K'_j при ионной силе раствора 0,2 были получены ранее методом ЯМР, их значения приведены в табл. 3. При расчете термодинамических параметров, характеризующих связывание динуклеозидфосфатов, значения K'_j принимались равными соответствующим значениям K'_j для комплекса РНКазы А с 2'-F-dUpA, так как ранее было показано, что изменение электронного состояния гистидинов РНКазы А в комплексе с этим лигандом близко к таковому для комплексов с производными цитидина [12].

Значения ΔH° , ΔG° и ΔS° , характеризующие связывание всех изученных соединений с ферментом, приведены в табл. 4 (дианионные ингибиторы) и в табл. 5 (моноанионные ингибиторы). Кроме того, в табл. 5 приведены величины изменения свободной энергии, происходящего при связывании с РНКазой А CpA и его алифатических аналогов, рассчитанные из соответ-

Величины констант диссоциации остатков His¹² и His¹¹⁹ в комплексах РНКазы А с лигандами, полученные методом ЯМР (32°, рН 5,5, I 0,2)

| Лиганд | pK_{12} | pK_{119} | Лиганд | pK_{12} | pK_{119} |
|----------|-----------|------------|------------------|-----------|------------|
| РНКазы А | 6,0 | 6,2 | 2'-F-3'-dUMP | 7,3 | 7,8 |
| 3'-CMP | 7,5 | 8,0 | 5'-AMP | 6,3 | 7,7 |
| 3'-UMP | 6,2 | 8,0 | 2'-F-3'-dUMP-OMe | 6,5 | 6,9 |
| 3'-C*MP | 8,0 | 8,0 | 2'-F-dUpA | 6,6 | 6,7 |
| 3'-C**MP | 8,0 | 8,0 | | | |

Таблица 4

Значения стандартных термодинамических параметров комплексообразования РНКазы А с нуклеотидами

| Лиганд | ΔH° | ΔG° | ΔS° , энтр. ед. | Лиганд | ΔH° | ΔG° | ΔS° , энтр. ед. |
|-------------|------------------|------------------|---------------------------------|----------|------------------|------------------|---------------------------------|
| | ккал/моль | | | | ккал/моль | | |
| 3'-CMP | 7,6 | 7,0 | -2,0 | 5'-AMP | 8,1 | 5,4 | -9,1 |
| 3'-UMP | 6,1 | 6,7 | 2,0 | 3'-C*MP | 12,1 | 6,8 | -7,8 |
| 2'-F-3-dUMP | 8,8 | 7,5 | -4,4 | 3'-C**MP | 6,6 | 6,8 | 0,7 |

Примечание. Значения вычислены из данных, приведенных в табл. 2, по уравнениям 4—6.

Таблица 5

Значения стандартных термодинамических параметров комплексообразования РНКазы А с аналогами субстратов

| Лиганд | ΔH° | ΔG° | ΔS° , энтр. ед. | Лиганд | ΔH° | ΔG° | ΔS° , энтр. ед. |
|-----------|------------------|------------------|---------------------------------|------------------|------------------|------------------|---------------------------------|
| | ккал/моль | | | | ккал/моль | | |
| dCpA | 6,4 | 4,3 | 7,0 | 2'-F-3'-dUMP-OMe | 10,6 | 5,1 | 18,4 |
| dCpA* | 6,4 | 4,1 | 7,7 | CpA | | 5,2 [6] | |
| C*pA | 8,5 | 4,1 | 14,7 | CpA* | | 5,2 [6] | |
| 2'-F-dUpA | 5,6 | 4,9 | 2,4 | C**pA | | 5,4 [5] | |

Примечание. Значения вычислены из данных, приведенных в табл. 2, по уравнениям 4—6.

ствующих величин K_m по уравнению (6). Во всех случаях в качестве стандартного состояния использовали концентрацию реагентов, равную 1М.

Для интерпретации данных табл. 4 и 5 необходимо рассмотреть, какие процессы, происходящие при образовании комплекса РНКазы А — нуклеотид, могут характеризоваться экспериментально наблюдаемыми ΔG° и ΔH° . При изучении динамики образования таких комплексов методом ЯМР нами было показано, что процесс связывания является, как минимум, двустадийным [20]. На первой стадии, проходящей со скоростью, близкой к скорости диффузии, происходит сорбция лиганда в активном центре фермента, определяющаяся взаимодействиями зарядов субстрата и белка. Следующий этап — фиксация «узнаваемого» нуклеозидного фрагмента, осуществляющаяся за счет водородных связей и ван-дер-ваальсовых взаимодействий. Из данных, полученных методом температурного скачка [21], известно, что свободная энергия системы изменяется в основном на первой стадии связывания и соответственно значения ΔG° , получаемые в равновесных экспериментах, в ряду нуклеозидмонофосфатов и динуклеозидфосфа-

тов должны быть близкими по величине, что хорошо согласуется с данными табл. 4 и 5. С этой точки зрения особенно интересно связывание РНКазы А с 5'-АМР (табл. 4). Фермент проявляет очень низкое сродство к пуриновым нуклеозидам [4]. Соответственно значение ΔG° для 5'-АМР в пределах ошибки эксперимента аналогично таковому для комплекса РНКазы А с ортофосфатом (5,4 ккал/моль) [9].

Наблюдаемые небольшие различия в величинах ΔG° связывания, по-видимому, можно отнести ко второй, «специфической» стадии. Известно, что электростатические взаимодействия носят в основном энтропийный характер [22] и не сопровождаются значительным выделением тепла. Отсюда следует, что выделение тепла Q , наблюдаемое при калориметрическом исследовании комплексообразования РНКазы А с нуклеотидами, является характеристикой изменения энергии системы на второй стадии взаимодействия, в результате которой устанавливаются многочисленные контакты между молекулами субстрата и фермента. Поскольку, как упоминалось выше, изменения в свободной энергии системы на этой стадии невелики, выделение тепла при образовании таких контактов, по-видимому, сопровождается компенсирующим изменением энтропии комплекса.

Таким образом, из сказанного выше следует, что измеряемые значения ΔG° в основном относятся к первой стадии комплексообразования и по существу служат характеристикой концентрации комплексов фермента. Специфические взаимодействия субстрата с РНКазой А, осуществляющиеся на второй стадии взаимодействия, характеризуются выделяющимся в результате комплексообразования теплом.

Анализ табл. 4 показывает, что природа гетероциклического основания и гликозидного фрагмента лигандов мало сказывается на изменении свободной энергии, происходящем при связывании нуклеозид-3'-фосфатов с ферментом. Единственным исключением является комплекс фермента с 2'-F-3'-dUMP, в котором замена 2'-гидроксильной группы на атом фтора увеличивает ΔG° на 0,8 ккал/моль по сравнению с 3'-UMP. Однако из сопоставления величин энтальпии комплексообразования следует, что важную роль в характере изменения энергии системы играет 2'-гидроксильная группа лигандов. Из табл. 4 видно, что в термодинамических параметрах связывания 3'-С*МР и 3'-С**МР наблюдается различие, показывающее, что присутствие 2'-ОН-группы приводит к уменьшению потери тепла Q при фиксации нуклеотида в активном центре фермента на 5,5 ккал/моль.

Другой аспект роли 2'-гидроксильной группы субстратов в характере энергетических изменений, происходящих при образовании комплексов РНКазы А с динуклеозидфосфатами, следует из сравнения величин ΔG° связывания dCrA, CrA и соответствующих негликозидных аналогов (табл. 5). Из данных, приведенных в табл. 5, видно, что наличие в субстрате 2'-ОН-группы вызывает увеличение изменения свободной энергии связывания на 1 ккал/моль. Если принять, как это было сделано ранее, что значения ΔG° для динуклеозидфосфатов на первой стадии связывания близки по величине и что взаимодействие 2'-ОН-группы нуклеотидов и динуклеозидфосфатов с ферментом вызывает аналогичные изменения ΔH° , то из полученных данных следует, что связывание рибонуклеозидфосфатов с РНКазой А сопровождается меньшими потерями энтропии, чем в случае дезоксианалогов, и соответственно более выгодно с точки зрения запасающей энергии.

Одним из наиболее интересных вопросов, возникающих при изучении молекулярного механизма действия РНКазы А, является вопрос о том, чем обусловлена зависимость между природой уходящей группы и числом оборотов реакции. Различие в константах скоростей ферментативного расщепления CrA и метилового эфира 3'-СМР достигает почти четырех порядков — соответственно 3000 и 0,5 с⁻¹ при pH 7,0 [7]. Определение вклада аденинового фрагмента лигандов в наблюдаемые термодинамические параметры комплексообразования было проведено при изучении связыва-

ния РНКазы А с 2'-F-dUpA и метиловым эфиром 2'-F-3'-dUMP (табл. 5).

Как уже было показано, из сравнения величин связывания 5'-AMP и ортофосфата следует, что наличие аденозинового фрагмента практически не сказывается на изменении свободной энергии системы. Исходя из экспериментальной ошибки определения ΔG° связывания остатка аденозина составляет $\leq 0,4$ ккал/моль. Аналогичный результат получается при сопоставлении величин ΔG° для 2'-F-dUpA и метилового эфира 2'-F-3'-dUMP. В то же время связывание 5'-AMP с РНКазой А сопровождается выделением 8,1 ккал/моль тепла, что говорит о наличии контактов между остатком нуклеозида и ферментом. Этот вывод хорошо согласуется с данными, полученными методом ЯМР [12], из которых следует, что адениновый фрагмент динуклеозидфосфата находится в «стэкинг»-взаимодействии с имидазольным циклом His¹¹⁹. Сравнение величин энтальпии комплексообразования аналогов «быстрого» и «медленного» субстратов (динуклеозидфосфата и метилового эфира 3'-мононуклеотида) показывает, что наличие в молекуле субстрата аденилового фрагмента уменьшает общую теплоту связывания на 5 ккал/моль. Таким образом, осуществляется ситуация, уже наблюдавшаяся при введении в молекулу лиганда 2'-ОН-группы. В рассматриваемом конкретном случае различие в величинах ΔH° соответствует увеличению скорости реакции в $\sim 10^4$ раза, что и наблюдается в кинетических экспериментах [7].

Таким образом, наличие остатка аденозина в молекуле субстрата обеспечивает аккумуляцию дополнительного количества энергии фермент-субстратными комплексами, которое может быть затрачено на катализ. Необходимо отметить, что замена рибофуранозного цикла в 5'-нуклеозидном фрагменте молекулы CpA на алифатический аналог, приводящая к значительному уменьшению числа оборотов ферментативной реакции [6], практически не влияет на термодинамические параметры связывания лиганда (табл. 5). По-видимому, уменьшение относительной «жесткости» уходящего остатка нуклеозида не сказывается на общей энергии фермент-субстратного комплекса и основным с этой точки зрения является наличие пуринового гетероцикла. Наблюдаемое уменьшение скорости катализируемой реакции скорее всего связано с дестабилизацией переходного состояния.

Как уже упоминалось ранее, в качестве промежуточного соединения реакции, катализируемой РНКазой А, постулируется дианионное пятиковалентное соединение фосфора (рис. 1). Аналогами такого производного в первом приближении могут служить нуклеозидфосфаты. В связи с этим сравнение данных, приведенных в табл. 4 и 5, позволяет оценить, насколько увеличится скорость ферментативной реакции в случае образования промежуточного дианионного производного субстрата и по сравнению с другими возможными механизмами процесса, не предусматривающими изменение ионного состояния остатка фосфата. Из сравнения величин ΔG° связывания нуклеозид-3'-фосфатов и соответствующих динуклеозидфосфатов следует, что различия в изменениях свободной энергии связывания равны 1,9—2,7 ккал/моль. По-видимому, эти величины соответствуют нижнему пределу возможных различий в ΔG° связывания субстратов и промежуточного соединения. Из данных рентгеноструктурного анализа вытекает, что по положению остатка фосфата в активном центре РНКазы А нуклеозид-2'-фосфаты — более близкие аналоги промежуточного соединения, чем нуклеозид-3'-фосфаты [23]. Свободная энергия связывания нуклеозид-2'-фосфатов на 1,5 ккал/моль выше, чем ΔG° для соответствующих нуклеозид-3'-фосфатов [9]. Следовательно, различия в ΔG° для субстрата и интермедиата реакции составляют ~ 4 ккал/моль, что соответствует ускорению ферментативной реакции в $\sim 10^3$.

Проведенный анализ роли «неузнаваемых» РНКазой А фрагментов субстратов реакции трансэтерификации еще раз подтвердил определяющее значение многоточечных контактов в активных центрах ферментов [24],

увеличение числа которых уже на стадии образования фермент-субстратного комплекса оптимизирует условия протекания ферментативной реакции.

Экспериментальная часть

РНКаза А, свободную от фосфата и следов димеров, получали способом, аналогичным описанному в работе [25]. 3'-СМР и 3'-UMP готовили хроматографическим разделением смеси изомеров 2'(3')-СМР и 2'(3')-UMP по методу, охарактеризованному в работе [26]. 5'-AMP (Fluka, Швейцария) применяли без дополнительной очистки. 2'-F-3'-dUMP, соответствующий метиловый эфир и 2'-F-dUpA получали способом, аналогичным описанному ранее [27]. Остальные лиганды, использованные в настоящей работе, были любезно предоставлены В. Л. Флорентьевым.

Все растворы готовили на деионизованной дистиллированной воде, и все реагенты были марки ос.ч. Концентрацию РНКаза А и нуклеотидов определяли спектрофотометрически при рН 5,5, используя следующие значения коэффициентов молярной экстинкции: ϵ ($\lambda_{\text{макс}}$, нм) 3'-СМР — 9200 (271), 3'-UMP — 10 000 (262) [28], 2'-F-3'-dUMP — 9700 (260) [27], 5'-AMP — 15 300 (259) [28], 3'-С*МР — 7900 (273), 3'-С**МР — 7900 (273), dCpA — 22 500 (265), dCpA* — 23 000 (264), С*pA — 23 000 (264) [29], 2'-F-dUpA — 19 000 (262), 2'-F-3'-dUMP-OMe — 9800 (260) [27]. Спектры поглощения снимали с помощью спектрофотометра «Specord UV-VIS» (ГДР).

Калориметрические эксперименты проводили на дифференциальном переворачивающемся микрокалориметре (ЛКВ, США) с рабочим объемом кювет 2,0 и 4,0 мл. Прибор калибровали как электрически, так и по известным теплотам разбавления растворов NaCl. Все измерения проводили при 25°. Растворы исследуемых веществ готовили в буферном растворе 0,1 М ацетата натрия, оттитрованном до рН 5,5 ледяной уксусной кислотой. Ионную силу буферного раствора доводили до 0,2 с помощью NaCl. Концентрацию РНКаза А варьировали от $5 \cdot 10^{-5}$ до $1 \cdot 10^{-4}$ М. Наблюдаемые тепловые эффекты были порядка $(2-3) \cdot 10^{-3}$ кал. В отдельных экспериментах определяли теплоты разбавления фермента, величина которых при используемых концентрациях лежит ниже пороговой чувствительности прибора. Концентрации ингибиторов в зависимости от величины K_{acc} варьировали от $1 \cdot 10^{-4}$ до $5 \cdot 10^{-3}$ М. При определении каждой K_{acc} калориметрическим методом использовали не менее семи различных концентраций ингибитора.

Авторы благодарят В. Л. Флорентьева за любезно предоставленные препараты модифицированных нуклеотидов, В. К. Антонова и Л. М. Гинодмана за плодотворную дискуссию и ценные критические замечания.

ЛИТЕРАТУРА

1. Barnard E. A. (1969) *Ann. Rev. Biochem.*, **38**, 677—685.
2. Usher D. A. (1969) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **62**, 661—667.
3. Roberts G. C. K., Dennis E. A., Meadows D. H., Cohen J. S., Jardetzky O. (1969) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **62**, 1151—1158.
4. Richards F. M., Wyckoff H. W. (1970) *The Enzymes*, **4**, 647—806.
5. Аврамова З. В. (1975) Канд. дис. «Молекулярные основы специфичности панкреатической рибонуклеазы», М.
6. Follman H., Wierer H.-J., Witzel H. (1976) *Eur. J. Biochem.*, **1**, 243—250.
7. Witzel H. (1963) *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* (Davidson T. N., Cohe W. E., eds.), vol. 2, pp. 221—238, Acad. Press, New York—London.
8. Jenks W. E. (1975) *Adv. Enzymol.*, **43**, 220—410.
9. Anderson D. G., Hammes G. C., Walz F. G. (1968) *Biochemistry*, **7**, 1673—1685.
10. Flogel M., Bolen D. W., Biltonen R. (1973) *Proteides of the Biological Fluids*, 20th Colloq. (Peeters H., ed.), pp. 521—540, Pergamon Press, N. Y.
11. Сахаровский В. Г. (1975) Канд. дис. «Изучение методом ЯМР строения активного центра РНКаза А и ее комплексов с нуклеотидами в растворе», М.

12. Antonov I. V., Gurevich A. Z., Dudkin S. M., Karpeisky M. Ya., Sacharovsky V. G., Yakovlev G. I. (1978) *Eur. J. Biochem.*, in press.
13. Meadows D. H., Jardetzky O. (1968) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **51**, 406—418.
14. Meadows D. H., Roberts G. C. K., Jardetzky O. (1969) *J. Mol. Biol.*, **45**, 491—511.
15. Haar W., Thompson J. C., Maurer W., Ruterjans H. (1973) *Eur. J. Biochem.*, **40**, 259—266.
16. Дудкин С. М., Карпейский М. Я., Сахаровский В. Г., Яковлев Г. И. (1975) Докл. АН СССР, **221**, 740—743.
17. Fogel M., Biltonen R. L. (1975) *Biochemistry*, **14**, 2603—2609.
18. Fogel M., Biltonen R. L. (1975) *Biochemistry*, **14**, 2610—2615.
19. Fogel M., Albert A., Biltonen R. L. (1975) *Biochemistry*, **14**, 2616—2621.
20. Antonov I. V., Dudkin S. M., Karpeisky M. Ya., Sacharovsky V. G., Yakovlev G. I. (1978) *Eur. J. Biochem.*, in press.
21. Hammes G. G. (1968) *Adv. Protein Chem.*, **23**, 1—57.
22. Kauzmann W. (1959) *Adv. Protein Chem.*, **14**, 1—882.
23. Павловский А. Г., Борисова С. Н., Вагин А. А., Карпейский М. Я. (1977) *Биоорганич. химия*, **3**, 1378—1386.
24. Ivanov V. I., Karpeisky M. Ya. (1969) *Adv. Enzymol.*, **32**, 21—53.
25. Карпейский М. Я., Дудкин С. М., Сахаровский В. Г., Шляпников С. В. (1974) в сб. Структура и функция активных центров ферментов (под ред. Торчинского Ю. М.), с. 183—203, «Наука», М.
26. Sohn G. W. (1950) *J. Amer. Chem. Soc.*, **72**, 2811—2820.
27. Антонов И. В., Дудкин С. М., Карпейский М. Я., Яковлев Г. И. (1976) *Биоорганич. химия*, **2**, 1209—1220.
28. Weaver G. H., Holiday E. R., Gonson E. N. (1955) in *The Nucleic Acids*, vol. 1, p. 513.
29. Михайлов С. Н., Колобушкина Л. И., Крицын А. М., Падюкова Н. Ш., Флорентьев В. Л. (1974) *Изв. АН СССР. Сер. хим.*, **11**, 2582—2591.

Поступила в редакцию
19.VII.1977

THERMODYNAMIC CHARACTERISTICS OF THE RIBONUCLEASE A BINDING WITH THE SUBSTRATE ANALOGS

ANTONOV I. V., DUDKIN S. M., KARPEISKY M. YA., PLATONOV A. L.,
PROTASEVICH I. I., YAKOVLEV G. I., CHERNAVSKY D. S.

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

The heats of complex formation (Q) and the association constants (K_a) of RNase A with various analogs of dinucleoside phosphates and nucleotides have been measured by means of difference microcalorimetry at 25° C, pH 5,5 and ionic strength of 0,2. From the data obtained the standard thermodynamic parameters (ΔH° , ΔG° and ΔS°) of binding were calculated. The binding of «unrecognizable» fragments of the substrate dinucleoside phosphate, viz. the ribose ring and leaving group, was found to increase the energy of the enzyme-substrate complex which can be utilized for subsequent catalytic stages. The results were shown to agree well with the hypothesis on the determining role of multi-point contacts in the enzyme active sites for the optimization of catalysis.