



УДК 577.159.022+543.422

ИЗУЧЕНИЕ СУБСТРАТНОЙ СПЕЦИФИЧНОСТИ  
И МЕХАНИЗМА ДЕЙСТВИЯ РИБОНУКЛЕАЗЫ  
*BACILLUS INTERMEDIUS* 7PКарнейский М. Я., Ханданян А. Ж., Чепурнова Н. К.,  
Платонов А. Л., Яковлев Г. И.

Институт молекулярной биологии Академии наук СССР, Москва

Показано, что РНКаза *Bacillus intermedius* 7P катализирует гидролиз динуклеозидфосфатов, проявляя специфичность к гуанозину на 3'-конце фосфодиэфирной связи. С помощью дифференциальной УФ-спектроскопии исследовано взаимодействие нуклеозид-3'-фосфатов с ферментом. Установлено, что в активном центре фермента специфически связываются только производные гуанозина. Методами стационарной кинетики изучена pH-зависимость кинетических параметров  $k_{\text{кат}}$  и  $K_m$  реакции гидролиза GrC. Найдено, что в реакции трансэтерификации участвуют один гистидиновый остаток и две карбоксильные группы фермента, находящиеся в ионизованном состоянии. Исследована роль ионогенных групп активного центра в образовании комплекса фермент-нуклеотид, структура которого изучалась методами  $^1\text{H}$ - и  $^{31}\text{P}$ -ЯМР-спектроскопии.

Внеклеточная РНКаза (КФ 3.1.4.23), продуцируемая споровыми бактериями вида *Bacillus intermedius* 7P, катализирует деполимеризацию полирибонуклеотидов, образуя олигонуклеотиды с концевыми 2',3'-циклофосфатами. Было показано, что poly(U), poly(C), poly(A) и poly(I) являются субстратами фермента, тогда как, согласно предварительным данным, нуклеозид-2',3'-циклофосфаты и ряд динуклеозидфосфатов (UpA, CpA, ApA, GrG) оказались устойчивыми к действию фермента [1].

Настоящая работа, продолжающая исследования по структуре и функции РНКазы *B. intermedius*, посвящена детальному анализу субстратной специфичности фермента и взаимодействию его с нуклеотидами.

Изучение действия гомогенного препарата РНКазы на нуклеозид-2',3'-циклофосфаты в широком диапазоне значений pH подтвердило сделанный ранее вывод о том, что  $\text{U} > \text{p}$ ,  $\text{C} > \text{p}$  и  $\text{A} > \text{p}$  не гидролизуются даже при высоких концентрациях фермента (табл. 1). Однако при нейтральных значениях pH в присутствии каталитических количеств фермента наблюдалось быстрое расщепление  $\text{G} > \text{p}$  с образованием 3'-GMP. Далее было показано, что РНКаза *B. intermedius* способна катализировать гидролиз ряда динуклеозидмонофосфатов при pH 7,0 (табл. 1), причем GrC гидролизуется по крайней мере в 100 раз быстрее, чем остальные динуклеозидфосфаты.

Чтобы выяснить, не является ли обнаруженная активность РНКазы *B. intermedius* примесной, была измерена активность в отношении различных субстратов во фракциях фермента, полученных методом препаративной электрофокусировки (рис. 1). Оказалось, что отношение активностей

Таблица 1

Результаты хроматографического анализа гидролиза моно-  
и динуклеозидфосфатов РНКазой *B. intermedius* при pH 7,0 и 25° С

Субстрат	[S]·10 <sup>4</sup> , М	[S]/[E]	Количество субстрата, трансформированного в продукт, %, через			Продукты
			10 мин	2 ч	24 ч	
G>p	0,87	1740	20	32	50	3'-GMP
A>p	1,0	900	0	0	0	—
C>p	1,0	600	0	0	0	—
U>p	1,0	700	0	0	0	—
GpC	1,1	2200	40	70	90	G>p, 3'-GMP, Cyd
ApA	1,4	70	*	20	30	A>p, Ado
CpA	2,5	100	*	15	35	C>p, Ado
ApC	1,1	300	0	0	*	A>p, Cyd
CpC	1,2	300	0	0	0	—

\* Наблюдались следы продуктов реакции.

Таблица 2

Константы ингибирования реакции гидролиза GpC РНКазой *B. intermedius*  
мононуклеотидами, константы ассоциации РНКазы с производными гуанозина,  
измеренные дифференциальной УФ-спектроскопией (рис. 3),  
и свободная энергия связывания комплекса фермент — нуклеотид  
Условия: pH 7,0; 25° С

Нуклеотид	$K_i^{-1} \cdot 10^{-3}$ , М <sup>-1</sup>	$\lambda_{\text{макс}}$ , нм	$\Delta \epsilon$ , М <sup>-1</sup> см <sup>-1</sup>	$K_{\text{асс}} \cdot 10^{-3}$ М <sup>-1</sup>	$-\Delta G$ , ккал/моль
3'-AMP	1,94				4,5
3'-CMP	2,01				4,5
3'-UMP	≈ 2				~4,5
3'-GMP	620	245	4300	620	7,9
3'-IMP		240	2750	310	7,5
9-(P-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> )-Ino		241	3550	220	7,3

фермента к РНК и GpC одинаково для каждой фракции. Таким образом, очевидно, что РНКаза *B. intermedius* проявляет специфичность к гуанозину на 3'-конце 3',5'-фосфодиэфирной связи при расщеплении динуклеозидфосфатов, т. е. является гуанилспецифичным ферментом по отношению к низкомолекулярным субстратам.

Для определения характера взаимодействия фермента с нуклеотидами было изучено влияние 3'-AMP, 3'-UMP, 3'-CMP и 3'-GMP на канализируемый РНКазой гидролиз GpC. Все исследованные мононуклеотиды проявляли конкурентный тип ингибирования, причем наиболее эффективным был 3'-GMP (табл. 2).

Дальнейшая информация о природе взаимодействия нуклеозидмонофосфатов с РНКазой была получена с помощью метода дифференциальной УФ-спектроскопии. При анализе УФ-спектров смесей 3'-AMP, 3'-CMP или 3'-UMP с РНКазой *B. intermedius* оказалось, что они являются аддитивными, тогда как в случае 3'-GMP наблюдался значительный разностный спектр (рис. 2). Как видно из рис. 2, в спектре комплекса 3'-GMP с РНКазой наблюдаются спектральные изменения в области 289,5, 260 и 244 нм (пик, плечо и впадина соответственно). Аналогичные изменения происходят при образовании комплекса 3'-GMP с гуанилспецифичной РНКазой T<sub>1</sub> [2, 3]. Они отражают взаимодействие гуанинового основания с белком [2]. Согласно работе [3], дифференциальный спектр комплекса РНКазы T<sub>1</sub> с 3'-GMP возникает в результате протонирования гуанинового основания нуклеотида протонодонорной группой фермента, а вклад за счет

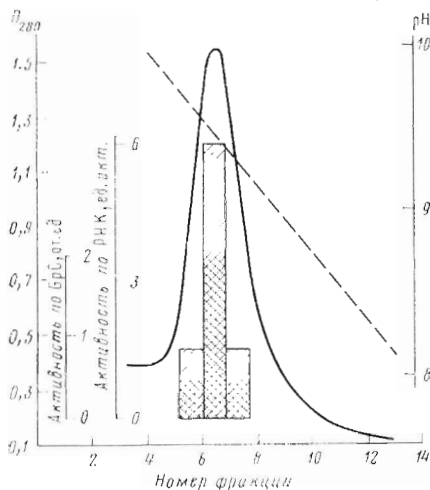


Рис. 1

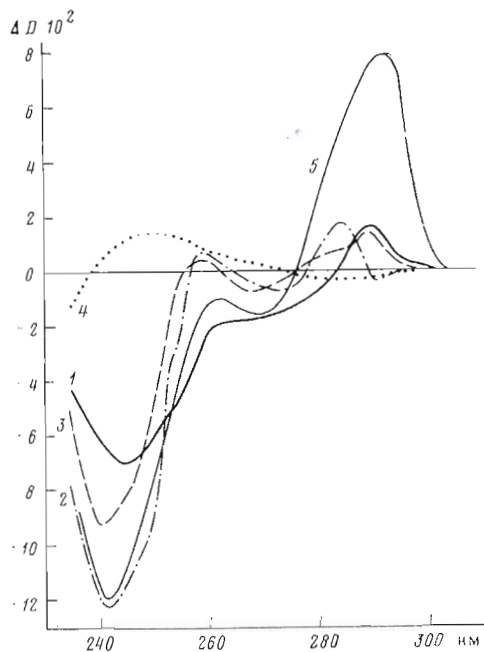


Рис. 2

Рис. 1. Активность различных фракций белкового пика РНКазы *B. intermedius*, изолированной методом изофокусирующего электрофореза, при гидролизе РНК (вертикальная штриховка) и ГрС при pH 6,0 и 25°С (косая штриховка). Пунктирная линия показывает градиент pH на колонке

Рис. 2. Разностные УФ-спектры комплексов РНКазы *B. intermedius* с 3'-GMP (1), 3'-IMP (2), 9-(P-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)-InO (3), гуанозином (4); 5 — разностный спектр комплекса РНКазы T<sub>1</sub> с 3'-CMP [2]. Концентрации (10<sup>-5</sup> М) лиганда и РНКазы равны соответственно: 4,71 и 2 (1), 7,85 и 4,42 (2), 5,69 и 4,42 (3), 7,35 и 2,44 (4), 26,5 и 9,5 (5); pH 6,0; 25°С

пертурбации спектров белка и лиганда отсутствует. Очевидно, появление разностного УФ-спектра при образовании комплекса РНКазы *B. intermedius* с 3'-GMP (в случае комплексов с 3'-AMP, 3'-CMP и 3'-UMP УФ-спектры аддитивны) обусловлено взаимодействием с белком гуанинового основания нуклеотида. Однако разностные спектры комплексов РНКазы *B. intermedius* и РНКазы T<sub>1</sub> с 3'-GMP заметно различаются, хотя и имеют качественное сходство (рис. 2). Поэтому становится очевидным, что образование комплекса РНКазы *B. intermedius* с 3'-GMP сопровождается не только протонированием гетероциклического основания, но и определенным возмущением хромофоров реагирующих молекул.

Чтобы определить влияние аминогруппы основания 3'-GMP на характер его взаимодействия с РНКазой, было изучено взаимодействие фермента с 3'-IMP. В разностном спектре комплекса РНКазы с 3'-IMP наблюдаются отличия от спектра комплекса с 3'-GMP: в области 262 нм появляется пик и поглощение минимума смещается с 242 до 244 нм. Эти изменения похожи на изменения в УФ-спектре фенилаланина, происходящие при увеличении гидрофобности среды. В УФ-спектре водного фенилаланина имеется характерный экстремум в области 257 нм, λ<sub>макс</sub> и ε которого возрастают, если фенилаланин растворен в менее полярном растворителе [4]. Поэтому смещение экстремума в области 260 нм и возрастание его интенсивности в разностном УФ-спектре при переходе от комплекса РНКазы с 3'-GMP к комплексу с 3'-IMP может свидетельствовать о локализации основания нуклеотида вблизи фенилаланинового остатка белка. Замена рибозы в 3'-IMP на ее алифатический аналог (9-(P-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)-

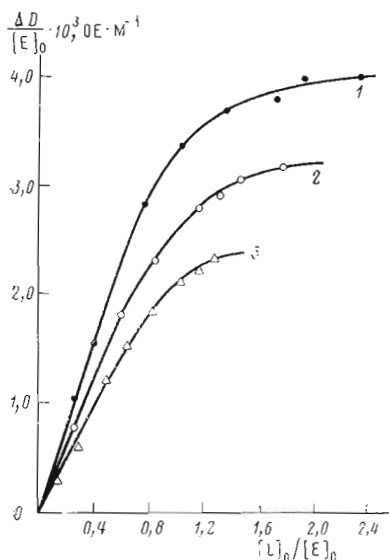


Рис. 3

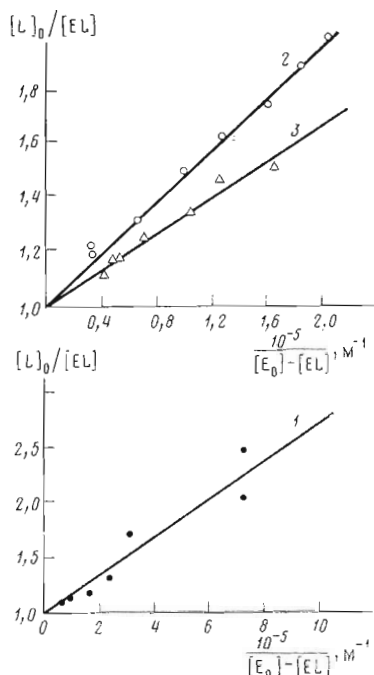


Рис. 4

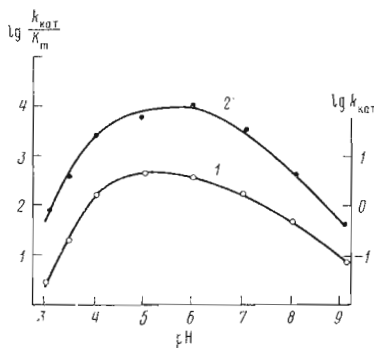


Рис. 5

Рис. 3. Зависимость разностного поглощения смеси производных гуанозина и РНКазы *B. intermedius* от отношения нуклеотид/белок: 1 — 3'-GMP, 2 — 9-(P-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)-InO, 3 — 3'-IMP

Рис. 4. Зависимость  $[L]_0/[EL]$  от  $1/([E]_0 - [EL])$  для комплексов РНКазы *B. intermedius* с 3'-GMP (1), 9-(P-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)-InO (2), 3'-IMP (3)

Рис. 5. Зависимость константы скорости  $k_{кат}$  (1) и отношения константы скорости к константе Михаэлиса  $k_{кат}/K_m$  (2) от pH для реакции гидролиза ГрС РНКазой *B. intermedius*

Ino) (рис. 2) приводила к небольшим различиям в дифференциальных УФ-спектрах комплексов фермента с 3'-IMP и его негликозидным аналогом, которые скорее всего отражают разницу в ориентации основания относительно группы белка в комплексах. При добавлении к раствору РНКазы гуанозина УФ-спектр незначительно отличался от суммы спектров исходных компонентов, причем наблюдавшиеся различия не имеют ничего общего с разностным спектром РНКазы и 3'-GMP. По-видимому, гуанозин неспецифически взаимодействует с РНКазой *B. intermedius*, образуя несколько типов комплексов.

Мы использовали дифференциальные УФ-спектры для определения констант ассоциации 3'-GMP и его производных с РНКазой. Для этого была измерена зависимость интенсивности поглощения от концентрации нуклеотида при постоянной концентрации белка (рис. 3). Интерпретацию данных проводили методами среднеквадратичного анализа, используя выражение

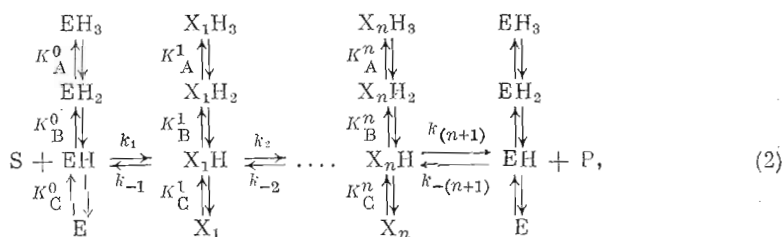
$$K_{асс} = \frac{[EL]}{[E][L]} = \frac{\Delta D_{\lambda} / \Delta \epsilon_{\lambda}}{([E]_0 - \Delta D_{\lambda} / \Delta \epsilon_{\lambda})([L]_0 - \Delta D_{\lambda} / \Delta \epsilon_{\lambda})}, \quad (1)$$

где  $K_{\text{асс}}$  — константа ассоциации,  $\Delta\epsilon_\lambda$  — дифференциальный молярный коэффициент поглощения при длине волны  $\lambda$ ,  $[E]_0$  и  $[L]_0$  — исходные концентрации РНКазы и лиганда.

Найденные константы связывания приведены в табл. 2. Для определения стехиометрического состава комплексов использовали зависимости  $[L]_0/[EL]$  от  $([E]_0 - [EL])^{-1}$  (рис. 4). Как было показано в работе [5], тангенс угла наклона прямой такого графика равен  $K_{\text{асс}}^{-1}$ , а отсекаемый отрезок на оси ординат равен количеству молекул лиганда в комплексе. Все исследованные производные гуанозина образовывали комплексы с РНКазой состава 1 : 1 (рис. 4). Совпадение величины константы связывания 3'-GMP, найденной из дифференциальных УФ-спектров, и обратной величины константы ингибирования этим нуклеотидом реакции гидролиза GrC (табл. 2) показывает, что концентрация комплекса ингибитор — фермент определяется истинной константой равновесия.

Поскольку константы ингибирования 3'-AMP, 3'-CMP и 3'-UMP близки между собой и образование их комплексов не сопровождается появлением разностного поглощения в УФ-области спектра, можно думать, что в этих комплексах отсутствует специфическое взаимодействие основания нуклеотида с белком. Полученные результаты позволяют считать, что РНКазы *B. intermedius* проявляет специфичность к основанию нуклеотидов в ряду: Gua > Ino >> Ade, Cyt, Ura.

Для выявления ионогенных групп фермента, участвующих в связывании субстрата и каталитическом акте, была исследована зависимость параметров  $k_{\text{кат}}$  и  $K_m$  от pH для реакции гидролиза GrC (рис. 5). Известно, что зависимость  $k_{\text{кат}}/K_m$  отражает ионизацию групп свободного фермента или свободного субстрата, которые принимают участие в образовании комплекса Михаэлиса и/или каталитическом акте [6, 7]. Для выбора модели, описывающей зависимость  $k_{\text{кат}}/K_m$  от pH, определялся максимальный угол наклона прямых, проведенных через экспериментальные точки возрастающей и убывающей ветвей этой зависимости [8]. Было найдено, что возрастающая (кислая область) ветвь определяется депротонированием двух ионогенных групп, а убывающая — депротонированием одной группы. Простейшая схема, описывающая эти данные, может быть записана в виде



где  $K_A^j$ ,  $K_B^j$  и  $K_C^j$  — константы диссоциации протонов ионогенных групп А, В, С;  $\text{EH}_i$  и  $\text{X}_i\text{H}_i$  — формы свободного фермента и фермент-субстратного комплекса на различных стадиях реакции.

Представленному механизму соответствуют следующие выражения, определяющие зависимость  $k_{\text{кат}}$  и  $k_{\text{кат}}/K_m$  от pH [8]:

$$k = \frac{\bar{k}_{\text{кат}}}{1 + \frac{[\text{H}]}{K_A^*} + \frac{[\text{H}]^2}{K_A^* K_B^*} + \frac{K_C^*}{[\text{H}]}} \quad (3)$$

$$\frac{k_{\text{кат}}}{K_m} = \frac{\bar{k}_{\text{кат}}/\bar{K}_m}{1 + \frac{[\text{H}]}{K_A^0} + \frac{[\text{H}]^2}{K_A^0 K_B^0} + \frac{K_C^0}{[\text{H}]}} \quad (4)$$

Таблица 3

Параметры, характеризующие механизм действия фермента, представленный схемой 2

Параметр	Значение	Параметр	Значение
$\bar{k}_{\text{кат}}, \text{с}^{-1}$	2,57	$pK_{\text{В}}^0$	4,4±0,1
$\bar{K}_{\text{м}}, \text{М}$	1,58·10 <sup>-4</sup>	$pK_{\text{В}}^*$	4,0±0,1
$pK_{\text{А}}^0$	4,2±0,1	$pK_{\text{С}}^0$	6,5±0,1
$pK_{\text{А}}^*$	4,2±0,1	$pK_{\text{С}}^*$	7,0±0,1

где  $K_{\text{А}}^0$ ,  $K_{\text{В}}^0$  и  $K_{\text{С}}^0$  — константы кислотной диссоциации свободного фермента,  $K_{\text{А}}^*$ ,  $K_{\text{В}}^*$  и  $K_{\text{С}}^*$  — кажущиеся константы кислотной диссоциации фермент-субстратного комплекса,  $\bar{k}_{\text{кат}}$  и  $\bar{K}_{\text{м}}$  — число оборотов и константа Михаэлиса, не зависящие от pH.

Значения этих констант, рассчитанные с использованием уравнений (3) и (4), даны в табл. 3. Из трех ионогенных групп с  $pK$  4,0; 4,3 и 6,5 одна (с  $pK$  4,3) может быть формально отнесена к цитозиновому основанию субстрата. Однако она относится к нуклеозиду на 5'-конце фосфодиэфирной связи, а РНКазы *B. intermedius* специфична к нуклеозиду на 3'-конце. Поэтому мало вероятно, чтобы ионизация этого основания влияла на pH-зависимость образования фермент-субстратного комплекса. Для гуанилспецифичной рибонуклеазы  $T_1$  справедливость такого вывода была показана сравнением pH-зависимостей  $k_{\text{кат}}/K_{\text{м}}$  в реакциях гидролиза GrC и GrU. В связи с этим мы считаем, что выявленные ионогенные группы принадлежат ферменту. Две из них, очевидно, карбоксильные группы, а одна (с  $pK$  6,5), по-видимому, имидазольное кольцо единственного в РНКазе гистидинового остатка. Правильность такой интерпретации подтвердил анализ <sup>1</sup>H-ЯМР-спектров РНКазы и ее комплекса с 3'-GMP.

В ароматической части спектра ЯМР РНКазы *B. intermedius* (рис. 6) в области 8—9 м.д. имеется pH-зависимый однопротонный сигнал (рис. 7). Положение этого сигнала в спектре, характер pH-зависимости и найденная из нее величина  $pK$ , равная 6,25±0,04, позволяют считать, что он относится к единственному гистидиновому остатку (His<sup>101</sup>) РНКазы. Значение  $pK$  этого гистидинового остатка близко к величине 6,5±0,1, найденной методами стационарной кинетики для одной из диссоциирующих групп фермента. При добавлении к раствору РНКазы 3'-GMP сигнал С2-протонов His<sup>101</sup> сдвигается в слабое поле. Изучение pH-зависимости химических сдвигов этих протонов в комплексе РНКазы с 3'-GMP показало, что указанный сдвиг обусловлен повышением  $pK$  гистидинового остатка до величины 7,54±0,04. Приведенные данные позволяют с высокой степенью вероятности утверждать, что His<sup>101</sup> расположен в активном центре фермента и является группой, определяющей характер зависимости  $k_{\text{кат}}/K_{\text{м}}$  в щелочной области pH. Таким образом, каталитическая активность РНКазы *B. intermedius* при гидролизе GrC контролируется ионизацией двух карбоксильных групп и имидазольного кольца His<sup>101</sup>. Активной форме фермента соответствует такое его состояние, когда обе карбоксильные группы ионизованы, а имидазольное кольцо гистидинового остатка несет положительный заряд. Повышение  $pK$  His<sup>101</sup> на 1,3 ед. pH при образовании комплекса РНКазы с 3'-GMP указывает, что имидазольное кольцо His<sup>101</sup> в комплексе сближено с отрицательно заряженной фосфатной группой нуклеотида.

Дальнейшее исследование структуры комплекса с использованием метода ЯМР на ядрах фосфора (рис. 8) показало, что сигнал <sup>31</sup>P фосфатной

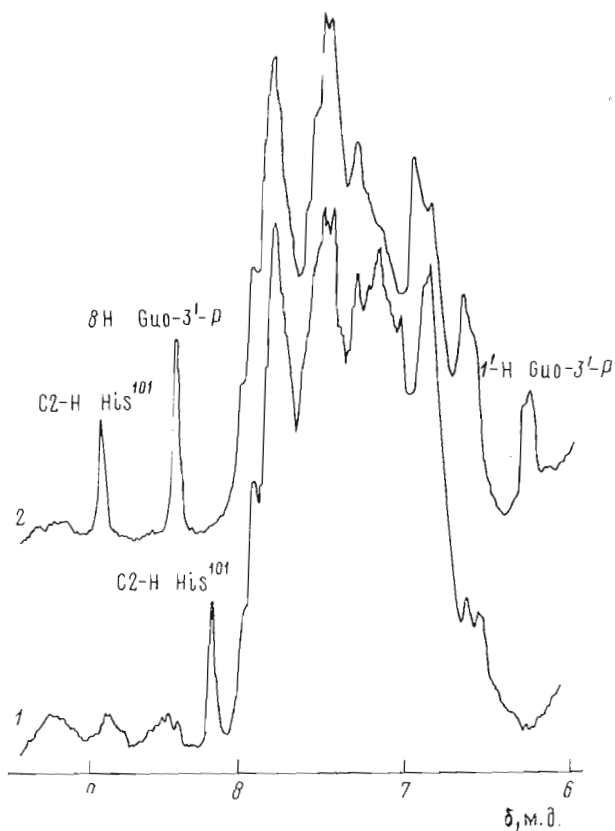


Рис. 6. Ароматическая область спектра  $^1\text{H}$ -ЯМР РНКазы *B. intermedius* (1) и ее комплекса с  $3'$ -GMP (2). Условия: pH 7,95;  $37^\circ\text{C}$

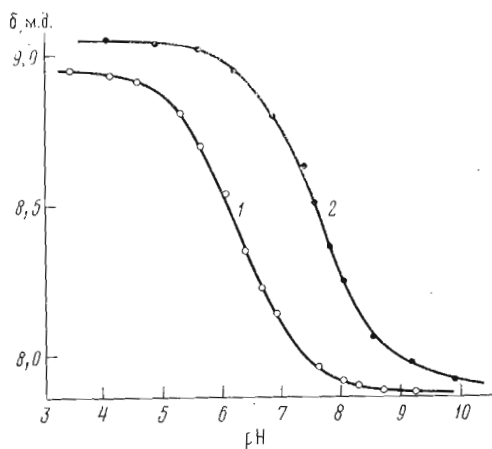


Рис. 7. Зависимость химических сдвигов протонов  $\text{C2-H His}^{101}$  РНКазы *B. intermedius* (1) и ее комплекса с  $3'$ -GMP (2)

группы  $3'$ -GMP в комплексе сдвигается в слабое поле по отношению к его положению в растворе в области pH 3,3–8,0, причем рК фосфатной группы повышается от 5,9 в растворе до 6,3 в комплексе. Изменение химических сдвигов  $^{31}\text{P}$  нуклеотида в комплексе в указанном диапазоне pH составляет 2,6 м.д., тогда как в растворе оно равно 4,1 м.д. При pH < 3,3 наблюдалось выпадение белка в осадок.

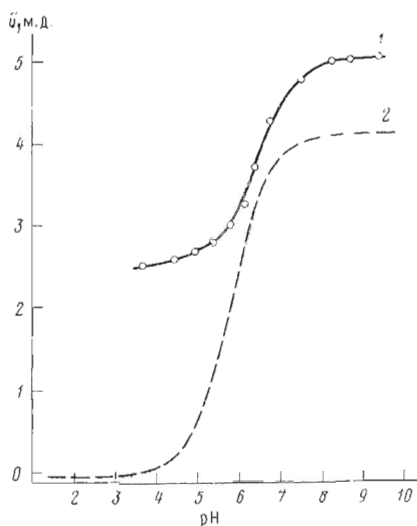


Рис. 8

Рис. 8. Зависимость химических сдвигов  $^{31}\text{P}$  3'-CMP в комплексе с РНКазой (1) и в растворе (2)

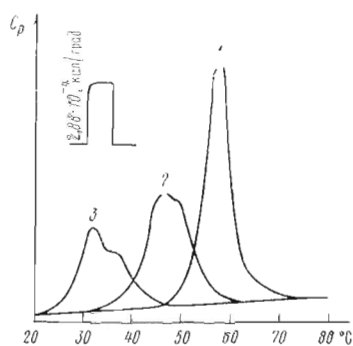


Рис. 9

Рис. 9. Температурная зависимость парциальной теплоемкости РНКазы *B. intermedius* при pH 5,6–6,6 (1), 3,1 (2), и 2,4 (3)

Различие химических сдвигов  $^{31}\text{P}$  фосфатной группы в комплексе и растворе, наблюдаемое для моно- и дианионной ее формы, очевидно, обусловлено изменением магнитного и/или электронного окружения. Следует считать, что благодаря атомам кислорода, окружающим атом фосфора, его химические сдвиги будут слабо зависеть от магнитного окружения. Так, ароматическое кольцо не может приблизиться к атому фосфора ближе чем на 0,49 нм, что соответствует максимально возможному изменению химического сдвига при этом ( $\sim 0,2$  м.д.) [10]. Непосредственное влияние близко расположенных заряженных групп на химический сдвиг фосфатной группы также, по-видимому, мало [11]. Однако взаимодействие фосфорной группы нуклеотидов с белковым окружением может приводить к изменению валентного угла  $\text{O}-\text{P}-\text{O}$  и соответственно к изменению электронной плотности на атоме фосфора [12]. Химические сдвиги  $^{31}\text{P}$  фосфатов, согласно работам [12, 13], изменятся значительно при небольших изменениях угла  $\text{O}-\text{P}-\text{O}$ . Изменение химического сдвига  $^{31}\text{P}$  нуклеозидмонофосфатов может достигать более 3 м.д. при изменении угла  $\text{O}-\text{P}-\text{O}$  на  $1^\circ$  [14].

В комплексе РНКазы *B. intermedius* с нуклеотидом, в котором фосфатная группа находится в дианионном состоянии, сдвиг сигнала  $^{31}\text{P}$  в слабое поле ( $\sim 1$  м.д.) по отношению к раствору вызван, по-видимому, небольшим уменьшением угла  $\text{O}-\text{P}-\text{O}$  за счет электростатического бидентантного взаимодействия дианиона с положительным зарядом (протонированным остатком гистидина) [12]. В моноанионном состоянии фосфатной группы ее сдвиг в слабое поле в комплексе с нуклеотидом — фермент составляет  $\sim 2,5$  м.д. Вероятнее всего, столь значительный сдвиг является результатом возникновения парциального отрицательного заряда на неонизованном атоме кислорода фосфатной группы, связанного водородной связью с протонированной карбоксильной группой фермента. Утверждение, что в комплексе фермент — нуклеотид фосфатная группа нуклеотида сближена с одной из карбоксильных групп активного центра фермента, базируется на совокупности полученных нами данных. Так, анализ спектра  $^1\text{H}$ -ЯМР комплекса фермент — нуклеотид показал, что в комп-



лексе имеется непосредственное взаимодействие между положительно заряженным имидазольным кольцом His<sup>101</sup> и фосфатной группой нуклеотида. Такое взаимодействие должно было бы приводить к понижению величины  $pK$  фосфатной группы. Однако в комплексе нуклеотид — белок  $pK$  фосфатной группы не уменьшается, а увеличивается на 0,4 единицы. Следовательно, вблизи фосфатной группы, заряд которой нейтрализован взаимодействием с His<sup>101</sup>, расположена отрицательно заряженная (карбоксилная) группа белка.

Как указывалось выше, в экспериментах по исследованию зависимостей ЯМР-параметров от pH наблюдалось выпадение осадков белка при pH ~3 и 37° С. Для выяснения причин неустойчивости растворов РНКазы *B. intermedius* при указанных условиях мы измеряли температуры денатурации фермента при различных pH методом дифференциальной сканирующей микрокалориметрии (рис. 9). При нейтральных pH температура денатурации была 57,2° С, при понижении pH она понижалась, при pH 2,4 до 30° С. Пики калориметрических кривых при низких значениях pH представлены двумя составляющими, показывающими, что при низких pH РНКазы *B. intermedius* существует, вероятно, в двух формах с различными температурами денатурации.

Таким образом, установлено, что РНКазы *B. intermedius* является гуанилспецифической в отношении низкомолекулярных субстратов. Основные черты структуры ее активного центра, выявленные из pH-зависимости кинетических параметров гидролиза GrC и структуры комплексов с нуклеотидами, имеют много аналогий с другими известными гуанилспецифическими РНКазами [15, 16].

### Экспериментальная часть

РНКазу *B. intermedius* получали по методике работы [1] из препарата отечественного производства. Нуклеотидные препараты были любезно предоставлены В. Л. Флорентьевым и Н. Ш. Падиюковой (Институт молекулярной биологии АН СССР).

Хроматографический анализ продуктов гидролиза динуклеозидфосфатов и нуклеотиддифосфатов проводили на бумаге H-18 (Whatman, Англия) в системе изопропанол — аммиак — вода, 7 : 1 : 2. Количественный анализ продуктов выполнялся путем элюирования с бумаги и спектрофотометрическим определением концентраций.

Изофокусирующий электрофорез проводили на приборе фирмы ЛКВ (Швеция) в стабилизирующей 1% смеси амфолинов, образующих на колонке размером 3×24 см градиент pH от 8 до 10, и градиенте плотности сахарозы от 40 до 0%. Длительность электрофореза 48 ч при напряжении 500 В и температуре 4° С, объем фракций 2 мл. Активность в белковом пике по отношению к РНК и GrC определяли, предварительно освободившись от амфолинов путем диализа против H<sub>2</sub>O.

Активность фермента по отношению к РНК измеряли следующим образом: к 1 мл 0,1 М раствора трис-НСl при pH 8,5, содержащего 1 мг РНК, добавляли фермент в количествах, гидролизующих РНК не более чем на 10% при инкубации в течение 15 мин при 37° С. Реакцию останавливали добавлением 0,2 мл 0,75% раствора уранилацетата в 25% HClO<sub>4</sub>. Затем смесь охлаждали, центрифугировали, отбирали 0,2 мл супернатанта, добавляли его в 10 раз водой и измеряли поглощение при 260 нм. За единицу активности фермента принимали такое его количество, которое в указанных условиях вызывает увеличение поглощения на 1 ОЕ в 1 мин. Удельную активность фермента определяли как отношение числа единиц фермента в 1 мл исследуемого раствора к поглощению этого раствора,  $D_{260}$ .

Спектральные измерения в области pH 4—9 проводили в буферной системе 0,05 М трис, 0,05 М ацетат натрия и 0,1 М NaCl, а в области pH 3—4 — в системе 0,1 М лимоннокислый натрий и 0,1 М NaCl. Значение pH

устанавливали добавлением уксусной или лимонной кислоты соответственно. Растворы готовили на деионизованной воде. pH измеряли на pH-метре «pH Meter 28» (Radiometer, Дания). Концентрацию нуклеотидов определяли спектрофотометрически, используя коэффициенты молярного поглощения, приведенные в работах [8, 18]. При всех спектральных измерениях образцы термостатировали при  $25 \pm 0,1^\circ \text{C}$ . Спектры поглощения, дифференциальные спектры и кинетические данные получали на спектрофотометре «Cary-118» (Varian, США). Дифференциальные спектры регистрировали, используя двойные кюветы (Helma, США) с длиной оптического пути каждой кюветы 0,438 см и объемом 1 мл. Концентрация белка в кюветках после добавления лиганда составляла  $2 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ , а нуклеотидов — от  $4 \cdot 10^{-6}$  до  $4 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ .

В экспериментах по гидролизу ГрС в зависимости от pH концентрация фермента была от  $1 \cdot 10^{-7}$  до  $4 \cdot 10^{-7} \text{ M}$ , а субстрата — от  $1 \cdot 10^{-5}$  до  $1 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ . Для расчета кинетической константы скорости реакции использовали коэффициент разностного молярного поглощения для ГрС  $\Delta \epsilon_{280} 2050 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  [8]. Определение  $k_{\text{кат}}$  и  $K_m$  проводили методом минимизации суммы взвешенных среднеквадратичных отклонений. Аналогичным образом проводили анализ pH-зависимостей кинетических параметров с целью определения рК групп,  $\bar{k}_{\text{кат}}$  и  $\bar{K}_m$  по уравнениям (3) и (4).

Спектры  $^1\text{H}$ - и  $^{31}\text{P}$ -ЯМР регистрировали на спектрометре XL-100-15 (Varian, США) при  $37^\circ \text{C}$ . Стабилизацию резонансных условий осуществляли по сигналу дейтерия растворителя ( $99,8 \text{ } ^2\text{H}_2\text{O}$ ). Химические сдвиги в  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектрах измерены относительно 2,2-диметил-2-силанпентансульфоната натрия, использованного в качестве внутреннего стандарта, а в  $^{31}\text{P}$ -ЯМР-спектрах — относительно  $85\% \text{ H}_3\text{PO}_4$  как внешнего стандарта. Химические сдвиги  $^{31}\text{P}$  нуклеотида в комплексе с РНКазой находили из зависимости сдвигов от отношения нуклеотид — белок при заданном значении pH [19].

Калориметрические измерения в процессе тепловой денатурации белка осуществляли на дифференциальном адиабатическом сканирующем микрокалориметре ДАСМ-1М (СССР) [20]. Растворы фермента готовили на деионизованной воде, pH раствора доводили до требуемого значения 0,1 н. соляной кислотой. Раствор белка с концентрацией 0,1% помещали в золотые ячейки калориметра с рабочим объемом 1 мл и прогревали со скоростью  $0,5^\circ/\text{мин}$ . Точность регистрации температуры составляла  $\pm 0,1^\circ$ .

Авторы благодарят Н. Ш. Падюкову и В. Л. Флорентьева (Институт молекулярной биологии АН СССР) за предоставление нуклеотидных препаратов, Г. И. Клейнера (Рига) за предоставление препарата фермента.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Голубенко И. А., Балабан Н. П., Лецинская И. Б., Волкова Г. И., Клейнер Г. И., Ченурнова Н. К., Афанасенко Г. А., Дудкин С. М. Рибонуклеаза *Bacillus intermedium* 7P. Очистка хроматографией на фосфоцеллюлозе и некоторые характеристики гомогенного препарата. — Биохимия, 1979, т. 44, вып. 4, с. 640—648.
2. Oshima T., Imahori K. Difference spectral studies on the interactions between ribonuclease  $T_1$  and its substrate analogues. — J. Biochem. (Tokyo), 1971, v. 69, № 5, p. 987—990.
3. Epinatjeff C., Pongs O. Ribonuclease  $T_1$ . Spectrophotometric investigations of the interaction of the enzyme with substrate analogues. — Eur. J. Biochem., 1972, v. 26, № 3, p. 434—441.
4. Фрайфелдер Д. Физическая биохимия. Применение физико-химических методов в биохимии и молекулярной биологии. М.: Мир, 1980, с. 388—392.
5. Wu C.-W., Hammes G. G. Relaxation spectra of aspartate transcarbamylase. Interaction of the native enzyme with an adenosine-5'-triphosphate analog. — Biochemistry, 1972, v. 12, № 7, p. 1400—1408.
6. Peller L., Alberty R. A. Multiple intermediates in steady state enzyme kinetics. I. The mechanism involving a single substrate and product. — J. Amer. Chem. Soc., 1959, v. 81, № 12, p. 5907—5914.
7. Alberty R. A., Bloomfield V. Multiple intermediates in steady state enzyme kine-

- tics. V. Effect of pH on the rate of a simple enzymatic reaction.— J. Biol. Chem., 1963, v. 238, № 5, p. 2804–2810.
8. Zabinski M., Walz F. G. Subsites and catalytic mechanism of ribonuclease T<sub>1</sub>: kinetic studies using GpC and GpU as substrates.— Arch. Biochem. and Biophys., 1976, v. 175, № 2, p. 558–564.
  9. Osterman H. L., Walz F. G. Subsites and catalytic mechanism of ribonuclease T<sub>1</sub>: kinetic studies using GpA, GpC, GpG and GpU as substrates.— Biochemistry, 1978, v. 17, № 20, p. 4124–4130.
  10. Aphanasenko G. A., Dudkin S. M., Kaminir L. B., Leshchinskaya I. B., Severin E. S. Primary structure of ribonuclease from *Bacillus intermedius* 7P.— FEBS Lett., 1979, v. 97, № 1, p. 77–80.
  11. Birdsall B., Roberts G. C. K., Feeney J., Burgen A. S. V. <sup>31</sup>P NMR studies of the binding of adenosine-2'-phosphate to *Lactobacillus casei* dihydrofolate reductase.— FEBS Lett., 1977, v. 80, № 2, p. 313–316.
  12. Gorenstein D. G. Dependence of <sup>31</sup>P chemical shifts on oxygen-phosphorus-oxygen bond angles in phosphate esters.— J. Amer. Chem. Soc., 1975, v. 97, № 4, p. 989–900.
  13. Gorenstein D. G. <sup>31</sup>P chemical shifts in phosphate diester monoanions. Bond angle and torsional angle effects.— Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1975, v. 65, № 3, p. 1073–1080.
  14. Gorenstein D. G. <sup>31</sup>P NMR of nucleic acids. Bond angle and torsional effects.— In: Nuclear magnetic resonance spectroscopy in molecular biology/Eds B. Pullman, D. Reidell. Dordrecht, Holland: Publishing Company, 1978, p. 1–15.
  15. Cozzone P. J., Jardetzky O. Phosphorus-31 Fourier transform nuclear magnetic resonance study of mononucleotides and dinucleotides. I. Chemical shifts.— Biochemistry, 1976, v. 15, № 22, p. 4853–4865.
  16. Arata Y., Kimura S., Matsuo H., Narita K. Proton and phosphorus nuclear magnetic resonance studies of ribonucleas T<sub>1</sub>.— Biochemistry, 1979, v. 18, № 1, p. 18–24.
  17. Yakovlev G. I., Karpeisky M. Ya., Bezborodova S. I., Beletskaja O. B., Sakharovskiy V. G. Guanyl-specific ribonuclease from the fungus *Penicillium chrysogenum* strain 152 and its complex with guanosine 3'-phosphate studied by nuclear magnetic resonance.— Eur. J. Biochem., 1980, v. 109, № 1, p. 75–85.
  18. Handbook of biochemistry and molecular biology. V. 1. Nucleic Acids, 1975, 3rd Edition, CRC Press.
  19. Gorenstein D. G., Wyrwicz A. <sup>31</sup>P NMR study on the binding of 3'-cytidine monophosphate to ribonuclease A. Part I.— Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1973, v. 54, № 3, p. 976–981.
  20. Privalov P. L., Plotnikov V. V., Filimonov V. V. Precision scanning microcalorimeter for the study of liquids.— J. Chem. Thermodyn., 1975, v. 7, № 1, p. 41–47.

Поступила в редакцию  
14.V.1981

## SUBSTRATE SPECIFICITY AND MECHANISM OF ACTION OF *BACILLUS INTERMEDIUS* 7P RIBONUCLEASE

KARPEISKY M. Ya., KHANDANYAN A. Zh., CHEPURNOVA N. K.,  
PLATONOV A. L., YAKOVLEV G. I.

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

A study of a transesterification reaction of dinucleoside monophosphates and of hydrolysis of nucleoside 2',3'-cyclophosphates catalyzed by ribonuclease *Bacillus intermedius* 7P revealed that the enzyme behaves like guanylspecific one. The interaction of nucleoside 3'-phosphates with the enzyme was studied by difference UV-spectroscopy. The results showed that only guanylnucleotides were capable of specific binding at the enzyme active site. To find whether any ionizable groups of the enzyme are involved in the catalysis, the study of pH profile for  $k_{cat}$  and  $K_m$  was carried out using GpC as substrate. One histidine residue and two ionized carboxylic groups were found to participate in the transesterification step of the reaction. The structure of the nucleotide-enzyme complex was studied by means of <sup>1</sup>H and <sup>31</sup>P NMR spectroscopy.