



УДК 547.96:543.422.23:577.155

**СТРУКТУРА КОМПЛЕКСОВ РИБОНУКЛЕАЗЫ А  
С ПИРИМИДИНОВЫМИ НУКЛЕОТИДАМИ В РАСТВОРЕ***Карнейский М. Я., Яковлев Г. И.**Институт молекулярной биологии Академии наук СССР, Москва**Сахаровский В. Г.**Институт биохимии и физиологии микроорганизмов  
Академии наук СССР, Пушкино*

Исследованы комплексы рибонуклеазы А с пиримидиновыми нуклеотидами в растворе методом ядерного магнитного резонанса. Найдена и проанализирована зависимость от рН химических сдвигов С2-, С4- и N1-протонов имидазольных колец His<sup>12</sup> и His<sup>119</sup> рибонуклеазы А и ее комплексов с нуклеотидами. Анализ полученных результатов показывает, что ближайшее окружение His<sup>12</sup> в комплексе фермента с производными цитидина и уридина различно. Сделан вывод, что наблюдаемое различие является следствием различного расположения протонодонорных и протонакцепторных групп гетероциклического основания нуклеотидов. Предложена модель строения продуктивного фермент-субстратного комплекса с идентичной системой водородных связей между ферментом и гетероциклическим основанием субстрата, фиксируемым в лактимной форме.

Исследованию структуры и физико-химических свойств комплексов РНКазы А (КФ 3.1.4.22) с нуклеотидами в растворе посвящено значительное количество работ [1—8]. В многочисленных исследованиях, выполненных методом ЯМР, основное внимание уделялось созданию модели комплекса в растворе и сопоставлению его структуры со структурой аналогичного комплекса в кристаллическом состоянии. Однако достоверность интерпретации полученных экспериментальных данных сомнительна, поскольку она базировалась на неправильном отнесении гистидиновых остатков активного центра РНКазы А [9—11]. Тем не менее было показано, что в растворе для комплексов фермента с Cud-3'-P и Urd-3'-P существуют различия в величине констант ионизации и микроокружении одного из гистидиновых остатков активного центра [12], тогда как в кристалле строение комплексов идентично [1]. Поскольку роль гистидиновых остатков активного центра РНКазы А является определяющей в механизме действия фермента [13], представляется важным исследование влияния природы пиримидинового основания субстратов на состояние их ионизации в фермент-субстратных комплексах. Ниже мы приводим результаты исследования комплексов РНКазы А с пиримидиновыми нуклеотидами методом ЯМР, выполненного с целью выяснения природы различий в структуре комплексов цитидин- и уридинсодержащих нуклеотидов и их проявлений в механизме действия фермента.

Зависимость химических сдвигов С2-протонов имидазольных колец

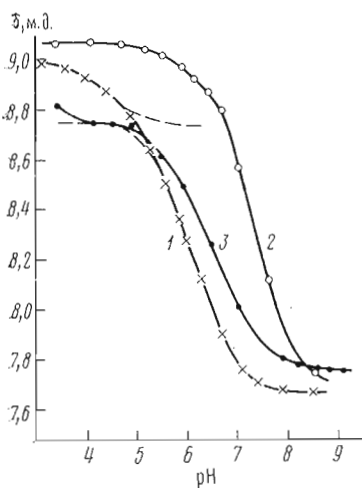


Рис. 1

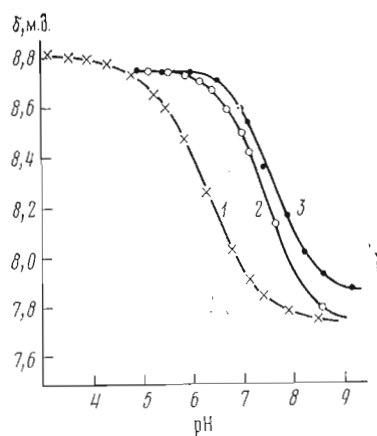


Рис. 2

Рис. 1. Зависимость химических сдвигов С2-протонов His<sup>12</sup> РНКазы А (1) и ее комплексов с Cyd-3'-P (2) и Urd-3'-P (3) от рН. Отношение белок – нуклеотид 1 : 10; t 32° С. Пунктиром показано влияние титрования группы с рК 4,68 на химические сдвиги С2-Н остатка His<sup>12</sup> РНКазы А, найденное в соответствии с моделью взаимодействия His<sup>12</sup> с независимо титрующей группой

Рис. 2. Зависимость химических сдвигов С2-протонов His<sup>119</sup> РНКазы А (1) и ее комплексов с Cyd-3'-P (2) и Urd-3'-P (3) от рН. Отношение белок – нуклеотид 1 : 10; t 32° С

His<sup>12</sup> и His<sup>119</sup> для РНКазы А и ее комплексов с Cyd-3'-P и Urd-3'-P от рН приведена на рис. 1 и 2. Ранее было показано, что зависимость химических сдвигов этих протонов от рН обусловлена не только титрованием имидазольного кольца, но отражает титрование и некоторых других групп [14]. Было отмечено, что His<sup>12</sup> и His<sup>119</sup> титруются кооперативно из-за их пространственной сближенности. Кроме того, зависимость химических сдвигов С2-протонов His<sup>12</sup> от рН отражает ионизацию некоторой независимо титрующей группы белка со значением рК, характерным для карбоксильных групп аспарагиновой или глутаминовой кислот [14]. Нами был проведен детальный анализ зависимостей от рН химических сдвигов С2-Н и С4-Н остатков His<sup>12</sup> и His<sup>119</sup> РНКазы А (таблица), результаты которого полностью согласуются с ранее сделанными выводами [14]. Действительно, на зависимость химических сдвигов С2-протона His<sup>12</sup> от рН оказывает влияние некоторая кислая группа с рК 4,68. Таким образом, сдвиг сигнала С2-Н остатка His<sup>12</sup> примерно на 0,3 м.д. в слабое поле по отношению к их положению для протонированного имидазольного кольца обусловлен влиянием группы с рК 4,68. Титрование этой группы не отражается на зависимости химических сдвига С4-протонов того гистидинового остатка от рН. Это свидетельствует об анизотропном характере влияния титрующей кислой группы на химические сдвиги протонов His<sup>12</sup>. Анализ зависимостей химических сдвигов С2-Н и С4-Н остатков His<sup>12</sup> и His<sup>119</sup> от рН показал, что для них коэффициент Хилла достоверно ниже единицы (для С2-протона His<sup>12</sup> анализ проводился при рН > 5, где отсутствует влияние указанной выше карбоксильной группы на зависимость химических сдвигов от рН). Использование модели взаимодействия имидазольного кольца гистидинового остатка с независимо титрующей группой давало рК независимо титрующей группы, близкое к рК имидазольного кольца ( $\Delta pK \leq 0,64$ ). Применение указанной модели в этом случае не правомерно для расчета констант ионизации титрующихся групп, и необходимо использовать модель взаимодействующих титрующихся групп [15]. Тем не менее это позволяло полагать, что взаимодействующими группами являются имидазольные кольца His<sup>12</sup> и His<sup>119</sup>.

Результаты среднеквадратичного анализа зависимостей химических сдвигов протонов His<sup>12</sup> и His<sup>119</sup> РНКазы А и ее комплексов с нуклеотидами и нуклеозидами от рН

Лиганд	рК	Коэффициент Хилла	Химический сдвиг, м.д.		
			$\sigma_{H^+}$	$\delta_0$	$\Delta\delta$
			C2-H (His <sup>12</sup> )		
Без лиганда	4,68±0,005	0,99±0,07	9,04±0,05	8,75±0,005	0,29
Cyd	6,11±0,005	0,85±0,07	8,75±0,05	7,74±0,005	0,99
Urd	6,40±0,10	0,79±0,05	8,92±0,07	7,79±0,07	1,15
Cyd-3'-P	5,68±0,10	0,67±0,05	8,76±0,05	7,76±0,05	1,00
Urd-3'-P	7,24±0,03	0,98±0,03	9,06±0,05	7,71±0,05	1,35
N1-(3'-HyPr)Cyt-3'-P *	6,44±0,05	0,99±0,03	8,76±0,05	7,77±0,05	0,99
N1-(3'-HyPr)Ura-3'-P *	7,80±0,05	0,97±0,05	8,91±0,05	7,78±0,05	1,13
	7,00±0,10	0,98±0,05	8,65±0,10	7,75±0,05	0,90
			C4-H (His <sup>12</sup> )		
Без лиганда	5,89±0,08	0,81±0,05	6,96±0,05	6,43±0,05	0,53
Cyd-3'-P	7,01±0,07	0,99±0,03	6,96±0,05	6,31±0,05	0,60
Urd-3'-P	6,49±0,05	0,98±0,03	6,92±0,03	6,41±0,03	0,51
			C2-H (His <sup>119</sup> )		
Без лиганда	6,19±0,05	0,78±0,04	8,83±0,05	7,83±0,05	1,00
Cyd	6,21±0,10	0,94±0,10	8,76±0,07	7,73±0,07	1,03
Urd	6,20±0,10	0,91±0,10	8,76±0,05	7,73±0,05	1,03
Cyd-3'-P	7,41±0,04	0,99±0,03	8,76±0,05	7,73±0,05	1,03
Urd-3'-P	7,54±0,04	0,98±0,03	8,76±0,05	7,84±0,05	0,92
N1-(3'-HyPr)Cyt-3'-P *	7,90±0,10	0,98±0,05	8,76±0,05	7,72±0,05	1,04
N1-(3'-HyPr)Ura-3'-P *	7,76±0,10	0,98±0,03	8,78±0,04	7,77±0,04	1,01
			C4-H (His <sup>119</sup> )		
Без лиганда	6,20±0,09	0,78±0,05	7,10±0,04	6,69±0,04	0,41
Cyd-3'-P	7,29±0,10	0,97±0,05	7,06±0,05	6,66±0,05	0,40
Urd-3'-P	7,61±0,10	0,95±0,05	7,06±0,05	6,70±0,04	0,36

\* N1-(3'-HyPr)Cyt-3'-P и N1-(3'-HyPr)Ura-3'-P — негликозидные производные нуклеотидов — N1-(3'-оксипропил)цитозин-3'-фосфат и N1-(3'-оксипропил)урацил-3'-фосфат.

Аналогичные результаты были получены при титровании комплексов РНКазы А с нуклеозидами (таблица).

Однако мы наблюдали, что в комплексах РНКазы А с нуклеотидами ситуация меняется. При анализе зависимостей от рН химических сдвигов C2- и C4-протонов His<sup>12</sup> и His<sup>119</sup> комплексов РНКазы А с Cyd-3'-P, Urd-3'-P и их негликозидными аналогами выяснилось, что в каждом случае имеет место титрование единственной моногенной группы — имидазольного кольца, т. е. взаимное влияние ионизации гистидиновых остатков отсутствует.

Очевидно, что независимое титрование His<sup>12</sup> и His<sup>119</sup> в комплексах РНКазы А с нуклеотидами может быть интерпретировано либо как увеличение расстояния между имидазольными кольцами указанных остатков по сравнению со свободным белком, либо как возрастание поляризуемости среды между ними.

Исследование строения комплексов РНКазы А с мононуклеотидами в растворе методом ЯМР с использованием эффекта Оверхаузера [6] позволяет заключить, что расстояние между имидазольными кольцами в комплексе не превышает 8 Å, т. е. той величины, которая была определена для РНКазы А или РНКазы S\* в кристалле [16—18] и в растворе [14]. Поэтому отсутствие кооперативности титрования His<sup>12</sup> и His<sup>119</sup> в комплексах РНКазы А с пиримидиновыми нуклеотидами объясняется скорее всего локализацией между имидазольными кольцами этих гистидиновых остатков легко поляризуемой группы. Можно полагать, что этой группой является ионизованная фосфатная группа нуклеотида, образующая с каждым из

\* РНКазы S — продукт ограниченного протеолиза РНКазы А субтилизином.

протонированных гистидиновых остатков ионную пару. Аналогичное явление — исчезновение кооперативности титрования двух близкорасположенных в белке гистидиновых остатков — наблюдалось нами для гуанилсפעцифичной РНКазы *Penicillium chrysogenum* при переходе от свободного белка и комплекса с Guo-3'-P [19].

Химические сдвиги С2-Н остатка His<sup>12</sup> в комплексах РНКазы А с пиримидиновыми нуклеотидами существенно различаются для производных цитидина и уридина (таблица), тогда как химические сдвиги С4-протона His<sup>12</sup> и С2- и С4-протонов His<sup>19</sup> как для одного, так и для другого типа комплекса практически одинаковы.

Поскольку различие химических сдвигов С2-Н остатка His<sup>12</sup> наблюдается для комплексов РНКазы А как с нуклеозидами, так и с нуклеотидами и их негликозидными аналогами, то очевидно, что оно обусловлено природой гетероциклических оснований. Идентичное положение сигналов С4-протона His<sup>12</sup> комплексов РНКазы А с Cyd-3'-P и Urd-3'-P указывает на то, что различие химических сдвигов С2-протонов обусловлено только различием их ближайшего окружения. Различное микроокружение имидазольного кольца His<sup>12</sup> в двух типах комплексов проявляется также в величинах кажущихся констант ионизации. Для комплексов РНКазы А с пиримидиновыми нуклеотидами, различающимися гетероциклическим основанием, величина рК His<sup>12</sup> различается приблизительно на 0,8 ед. рН.

Для дальнейшего анализа структуры комплексов РНКазы А с пиримидиновыми нуклеотидами в растворе необходимо рассмотреть данные об окружении His<sup>12</sup>, полученные при анализе кристаллического фермента. В непосредственной близости к имидазольному кольцу His<sup>12</sup> расположен участок полипептидной цепи и существует потенциальная возможность образования водородной связи между N1-протоном имидазола His<sup>12</sup> и карбонильной группой остатка Thr<sup>45</sup>, радикал которого определяет специфичность связывания пиримидинового основания [17—18]. Расчет доступности растворителю остатков РНКазы А показал, что для His<sup>12</sup> поверхность, доступная растворителю, не превышает 5 Å<sup>2</sup>, причем основной вклад в эту величину вносит доступность одного из атомов углерода имидазольного цикла [18, 20]. Таким образом, можно было ожидать, что N1-Н-группа имидазольного кольца His<sup>12</sup> будет недоступна молекулам воды и сигнал этой группы будет виден в ЯМР-спектре фермента в воде. Действительно, в спектре фермента в воде в интервале температур вплоть до 45°С в области 12—14 м.д. были обнаружены рН-зависимые сигналы, один из которых был отнесен к N1-протонам имидазольного кольца His<sup>12</sup> [21].

С целью более детального изучения микроокружения His<sup>12</sup> в комплексах РНКазы А с Cyd-3'-P и Urd-3'-P нами была изучена зависимость химических сдвигов N1-Н имидазольного цикла His<sup>12</sup> от рН (рис. 3). Сравнение химических сдвигов N1-протонов имидазольного кольца His<sup>12</sup> и его констант ионизации для РНКазы А и ее комплексов с нуклеотидами позволяет заключить, что отмеченная потенциальная возможность образования водородной связи между N1-Н-группой His<sup>12</sup> и карбонильной группой Thr<sup>45</sup>, вероятно, реализуется в комплексах только с производными цитидина. Действительно, сдвиг сигнала N1-протона His<sup>12</sup> в слабое поле в комплексе РНКазы А с Cyd-3'-P по сравнению со свободным белком указывает на образование водородной связи между N1-атомом имидазольного кольца и некоторой протоноакцепторной (вероятно, карбонильной) группой. Образование водородной связи с имидазольным кольцом должно сопровождаться изменением его константы ионизации. Действительно, при 32°С в комплексе РНКазы А с цитидином величина рК диссоциации His<sup>12</sup> больше по сравнению со свободным белком примерно на 0,3 ед. рН (таблица). Значение ΔрК His<sup>12</sup> при переходе от РНКазы А к ее комплексу с Cyd-3'-P равно 1,1 ед. рН, т. е. вклад фосфатной группы в ΔрК составляет около 0,8 ед. рН. Для комплекса РНКазы А с Urd-3'-P это увеличение ΔрК равно только 0,3 ед. рН. Более того, комплексообразование с

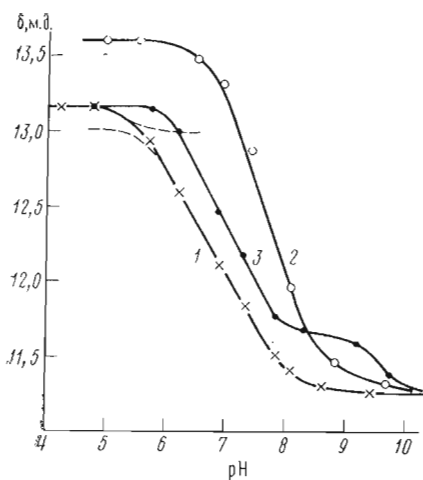


Рис. 3. Зависимость химических сдвигов  $N_1$ -протонов имидазольного кольца  $His^{12}$  РНКазы А (1) и ее комплексов с  $Cud-3'-P$  (2) и  $Urd-3'-P$  (3) от pH. Отношение белок — нуклеотид 1 : 10;  $t$  15° С. Пунктиром показано влияние карбоксильной группы на химические сдвиги  $N_1$ -протонов  $His^{12}$

уридином вызывает уменьшение  $pK$  на 0,5 ед. pH, т. е. влияние фосфатной группы вызывает изменение  $\Delta pK$  на 0,8 ед. pH. Следует отметить, что, по данным  $^{31}P$ -ЯМР, в комплексах РНКазы А с  $Cud-3'-P$  и  $Urd-3'-P$  величины химических сдвигов и  $pK$  фосфатной группы в обоих комплексах идентичны [4]. Другими словами, идентично окружение фосфатной группы в этих комплексах. Тогда, относительно небольшое повышение  $pK$   $His^{12}$  при образовании комплекса РНКазы А с  $Urd-3'-P$  указывает на то, что влияние нуклеозидного фрагмента в комплексе  $Urd-3'-P$  практически такое же, как и в комплексе с уридином. Это позволяет заключить, что в комплексах РНКазы А с производными уридина водородная связь между имидазолом  $His^{12}$  и карбонильной группой  $Thr^{45}$  отсутствует. Напротив, имидазольный цикл  $His^{12}$  выступает как акцептор протона, образуя водородную связь с некоторой протондонорной группой.

Полученные результаты могут быть интерпретированы на основе данных рентгеноструктурного анализа фермента, согласно которым в непосредственной близости к боковому радикалу  $Thr^{45}$  расположена карбоксильная группа остатка  $Asp^{83}$  [17, 18]. Вероятно, в РНКазе А аминокислотный остаток  $Thr^{45}$  может находиться в двух конформационных состояниях. В одном из них, реализуемом при ионизации карбоксильной группы  $Asp^{83}$ , между этой группой и ОН-группой  $Thr^{45}$  образуется водородная связь, фиксирующая остаток  $Thr^{45}$  в положении, при котором между карбонильной группой этого остатка и  $N_1$ -Н-группой имидазольного кольца  $His^{12}$  водородная связь не может образоваться. Во втором конформационном состоянии боковой радикал  $Thr^{45}$  расположен таким образом, что гидроксильная группа становится доступной растворителю и занимает то положение, которое наблюдалось в кристалле. В этой конформации между карбонильной группой  $Thr^{45}$  и имидазольным кольцом  $His^{12}$  образуется водородная связь. В спектре ЯМР образование такой водородной связи должно приводить к сдвигу сигнала С2-Н остатка  $His^{12}$  в слабое поле из-за анизотропного влияния карбонильной группы  $Thr^{45}$ .

Полученные экспериментальные данные по зависимости химических сдвигов имидазольных протонов  $His^{12}$  РНКазы А от pH хорошо согласуются с предложенной гипотезой. При нейтральных и щелочных значениях pH карбоксильная группа  $Asp^{83}$  ионизована и, по-видимому, образует водородную связь с ОН-группой  $Thr^{45}$ . В кислой области происходит протонирование карбоксильной группы  $Asp^{83}$ , сопровождающееся разрывом водородной связи, и остаток  $Thr^{45}$  переходит в конформацию с экспонированной оксигруппой и карбонильной группой, имеющей благоприятное расположение для образования водородной связи с  $N_1$ -атомом имидазольного кольца  $His^{12}$ . Действительно, в этой области значений pH сигнал

N1-H остатка His<sup>12</sup> сдвигается в слабое поле на 0,35 м.д. (рис. 3), а сигнал C2-H — на 0,29 м.д. (рис. 1).

В комплексах РНКазы А с производными цитидина между N3-атомом основания и гидроксильной группой Thr<sup>45</sup> образуется водородная связь [1, 2], исключая взаимодействие между Thr<sup>45</sup> и Asp<sup>83</sup>. Остаток Thr<sup>45</sup> во всей области существования комплекса находится в конформационном состоянии, для которого характерно существование водородного мостика между карбоксильной группой Thr<sup>45</sup> и N<sup>1</sup>-атомом His<sup>12</sup>.

В комплексах РНКазы А с производными уридина, гетероциклическое основание которых существует в лактамной форме, гидроксильная группа Thr<sup>45</sup> испытывает ван-дер-ваальсово отталкивание со стороны N3-протона основания, в результате чего реализуется такая конформация Thr<sup>45</sup>, при которой гидроксильная группа Thr<sup>45</sup> взаимодействует с карбоксильной группой Asp<sup>83</sup>, что исключает образование водородной связи между карбоксильной группой остатка Thr<sup>45</sup> и гистидином-12. Только в области рН, где происходит депротонирование N3-атома уридинового основания (рК 9,2), эта связь реализуется, что и проявляется в зависимости сигнала N1-H имидазольного цикла His<sup>12</sup> от рН (рис. 3). При титровании комплекса РНКазы А с Urd-3'-P следовало бы ожидать, что химический сдвиг N1-H остатка His<sup>12</sup> в кислой области рН, где His<sup>12</sup> полностью протонирован, будет соответствовать сдвигу сигнала N1-H, рассчитанному для свободной РНКазы А в отсутствие влияния анизотропии карбоксильной группы Thr<sup>45</sup>. Наблюдающийся более низкочастотный сдвиг рассматриваемого сигнала позволяет предположить существование лактам-лактимной изомеризации основания уридина в комплексе с РНКазой А (рис. 4). Доказательства изомеризации и соотношение лактимной и лактамной форм рассмотрены ниже.

Различие в значении рК остатка His<sup>12</sup> в комплексах, обусловленное природой пиримидинового основания и составляющее около 0,8 ед. рН, должно было бы проявляться при изучении зависимости кинетических параметров элимитической реакции для цитидин- и уридинсодержащих субстратов от рН. Однако сравнение рН-профилей  $k_{\text{кат}}$  для реакции гидролиза циклофосфатов уридина и цитидина, как и для CrA и UrA [22], показывает, что экспериментально такие различия не наблюдаются. Следовательно, природа пиримидинового основания субстрата практически не влияет на величину рК остатка His<sup>12</sup> в продуктивном фермент-субстратном комплексе. Очевидно, такой результат следует ожидать только в том случае, если количество и тип протонодонорных и протоноакцепторных связей между гетероциклическим основанием субстрата и белком не зависят от природы пиримидинового основания субстрата. Следовательно, в продуктивном фермент-субстратном комплексе гетероциклическое основание уридинсодержащих субстратов должно находиться в лактимной форме. Константы скоростей реакций, катализируемых РНКазой А, с участием цитидинсодержащих субстратов примерно в 3—4 раза превышают соответствующие константы для их уридиновых аналогов [22—24]. Можно предположить, что для уридинсодержащих субстратов продуктивной является только третья часть комплексов, т. е. комплексы, в которых основание нуклеотида существует в лактимной форме. Это предположение хорошо согласуется с тем, что в <sup>15</sup>N-ЯМР-спектре обогащенного изотопом <sup>15</sup>N Urd-3'-P, находящегося в комплексе с РНКазой А, наблюдаются два сигнала, соответствующие N3-атому основания с соотношением интенсивностей 3:1 [25]. Сравнение положений этих сигналов в спектре ЯМР комплекса с сигналами N3-атома Urd-3'-P при различных значениях рН позволяет заключить, что более интенсивный сигнал в спектре комплекса соответствует протонированному состоянию атома N3, а менее интенсивный — депротонированному.

В качестве экспериментального свидетельства в пользу предложенной гипотезы следует рассматривать наличие корреляции между поляризуе-

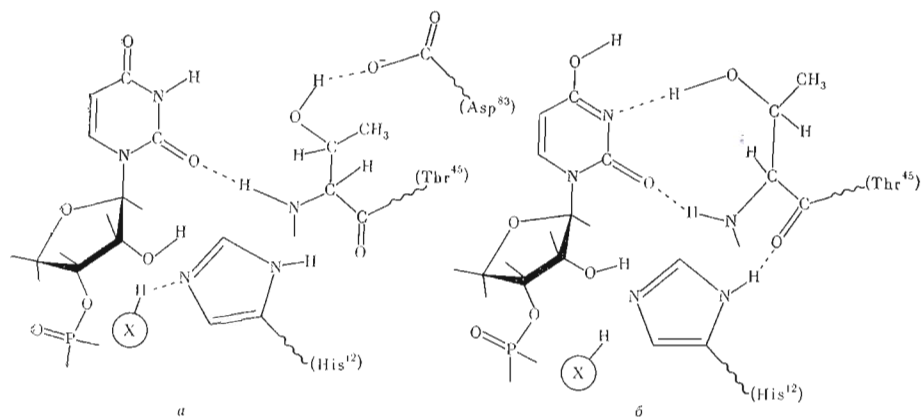


Рис. 4. Схематическое изображение комплексов РНКазы А с лактамной (а) и лактимной (б) формами Urd-3'-P

мостью карбонильной группы уридинсодержащих субстратов РНКазой А и скоростью их расщепления ферментом [26]. Указанием на непродуктивность комплексов РНКазы А с уридинсодержащими субстратами, гетероциклическое основание которых находится в лактамной форме, служит тот факт, что N3-оксид Urd-2',3'-циклофосфата не гидролизуется РНКазой А [24, 27]. При этом соответствующий нуклеозид-3'-фосфат образует комплекс с РНКазой А и гетероциклическое основание нуклеотида связывается в пиримидинсвязывающем участке активного центра фермента [5, 28].

#### Экспериментальная часть

В работе были использованы хроматографически чистые образцы нуклеотидов и препараты РНКазы А и РНКазы S, свободные от фосфата и димеров [9]. Негликозидные аналоги нуклеотидов — N1-(3'-HyPr)Urd-3'-P и N1-(3'-HyPr)Cyt-3'-P — были предоставлены В. Л. Флорентьевым (ИМБ АН СССР). Их получение описано в работе [29].

Препарат РНКазы А для замены подвижных протонов на дейтерий выдерживали 2 сут в растворе  $^2\text{H}_2\text{O}$  (99,8%, SIC, США) при концентрации 0,5%, pH 7 и 30°С, затем лиофильно высушивали. Активность дейтерированной РНКазы А при ферментативном гидролизе Urd-2',3'-циклофосфата была не менее 95% относительно исходного препарата. Образцы для анализа методом ЯМР приготавливали в виде 5 мМ растворов РНКазы А в  $^2\text{H}_2\text{O}$  с ионной силой 0,25 (0,2 М NaCl, 0,05 М  $\text{CH}_3\text{COONa}$ ). Значение pH задавали добавлением  $^2\text{HCl}$  или  $\text{NaO}^2\text{H}$ . Измерения pH проводили на pH-метре РНМ 64 (Radiometer, Дания), снабженном специальными микроэлектродами. pH измеряли до и после снятия спектра ЯМР и результат использовали, если различие не превышало 0,04 ед. pH.

Спектры ЯМР снимали на приборах HA-100D и XL-100-15 (Varian, США). Спектрометр HA-100D использовали совместно с накопителем спектров C-1024, а XL-100-15 — с компьютером VDM 620. Стабилизацию резонансных условий осуществляли по протонному или дейтериевому сигналам растворителя соответственно. Все значения химических сдвигов измеряли относительно 2,2-диметил-2-силанпентан-5-сульфоната как внутреннего стандарта.

Константы ионизации гистидиновых остатков рассчитывали из зависимостей химических сдвигов их протонов от pH, используя уравнение [30]:

$$\delta_{\text{набл}} = \delta_0 + \Delta\delta \frac{K^n}{K^n + [\text{H}^+]^n},$$



где  $\delta_{\text{набл}}$  — наблюдаемый химический сдвиг протонов при данной концентрации водородных ионов;  $\delta_0$  — химический сдвиг протонов для непротонированной формы имидазольного кольца гистидинового остатка;  $\Delta\delta$  — разность химических сдвигов протонов для протонированной и непротонированной форм имидазольного кольца.

При  $n < 1$  проводили анализ химических сдвигов, используя модель взаимодействия гистидинового остатка с независимо титрующейся группой [15]:

$$\delta_{\text{набл}} = \delta_0 + \Delta\delta_1 \frac{10^{pK_1 - pH}}{1 + 10^{pK_1 - pH}} + \Delta\delta_2 \frac{10^{pK_2 - pH}}{1 + 10^{pK_2 - pH}},$$

где  $\Delta\delta_1$  — разность химических сдвигов протонов имидазольного кольца, обусловленная влиянием независимо титрующейся группы;  $\Delta\delta_2$  — разность химических сдвигов протонов для протонированной и непротонированной форм имидазольного кольца.

Для расчетов была использована компьютерная программа нелинейного среднеквадратичного анализа ТТРМЗВ, разработанная А. З. Гуревичем (ИБХ АН СССР, Москва).

Авторы благодарят В. Л. Флорентьева за предоставление негликозидных аналогов нуклеотидов и А. Э. Гуревича за предоставленную возможность использования программы ТТРМЗВ.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Benz F. W., Roberts G. C. K. The interaction of nucleotides with bovine pancreatic ribonuclease.— In: Physico-Chemical properties of nucleic acids. Duchense I. N. Y.: Acad. Press., 1973, v. 3, p. 77–138.
2. Павловский А. Г., Борисова С. Н., Вагин А. А., Карпейский М. Я. Структура комплексов рибонуклеазы с пиримидиновыми нуклеотидами.— Биоорг. химия, 1977, т. 3, № 10, с. 1378–1386.
3. Meadows D. H., Roberts G. C. K., Jardetzky O. Nuclear magnetic resonance studies of the structure and binding sites of enzymes. VIII. Inhibitor binding to ribonuclease.— J. Mol. Biol., 1969, v. 45, № 4, p. 491–511.
4. Haar W., Thompson I. C., Maurer W., Ruterjans H. Investigation of nucleotide-ribonuclease A complexes with high-resolution  $^{31}\text{P}$ -nuclear-magnetic-resonance spectroscopy.— Eur. J. Biochem., 1973, v. 40, № 1, p. 259–266.
5. Haar W., Maurer W., Ruterjans H. Proton-magnetic-resonance studies of complexes of pancreatic ribonuclease A with pyrimidine and purine nucleotides.— Eur. J. Biochem., 1974, v. 44, № 1, p. 201–211.
6. Карпейский М. Я., Яковлев Г. И. Применение ядерного эффекта Оверхаузера для исследования строения комплексов рибонуклеазы с нуклеотидами.— Биоорг. химия, 1976, т. 2, № 9, с. 1221–1230.
7. Karpeisky M. Ya., Yakovlev G. I. Does 3'-cytidine monophosphate bound to ribonuclease A acquire *syn*-conformation? — FEBS Lett., 1977, v. 75, № 1, p. 70–72.
8. Antonov I. V., Gurevich A. Z., Dudkin S. M., Karpeisky M. Ya., Sakharovsky V. G., Yakovlev G. I. Complexes of ribonuclease A with 2'-deoxy-2'-fluororibose substrate analogues studied by nuclear magnetic resonance.— Eur. J. Biochem., 1978, v. 87, № 1, p. 45–54.
9. Дудкин С. М., Карпейский М. Я., Сахаровский В. Г., Яковлев Г. И. О конформации активного центра рибонуклеазы А в растворе.— Докл. АН СССР, 1975, т. 221, № 3, с. 740–743.
10. Patel D. L., Canuel L. L., Bovey F. A. Reassignment of the active site histidines in ribonuclease A by selective deuteration studies.— Biopolymers, 1975, v. 14, № 5, p. 987–997.
11. Markley J. L. Correlation proton magnetic resonance studies at 250 MHz of bovine pancreatic ribonuclease. I. Reinvestigation of the histidine peak assignments.— Biochemistry, 1975, v. 14, № 16, p. 3546–3554.
12. Mighelsen C., Beintema I. I. Proton nuclear magnetic resonance studies of histidine residues in rat and other rodent pancreatic ribonucleases. Effects of pH and inhibitors.— J. Mol. Biol., 1973, v. 79, № 1, p. 25–38.
13. Roberts G. C. K., Dennis E. A., Meadows D. H., Cohen J. S., Jardetzky O. The mechanism of action of ribonuclease.— Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1969, v. 62, № 4, p. 1151–1158.
14. Markley J. L., Finkenstadt W. R. Correlation proton magnetic resonance studies at 250 MHz of bovine pancreatic ribonuclease. III. Mutual electrostatic interaction between histidine residues 12 and 119.— Biochemistry, 1975, v. 14, № 16, p. 3562–3566.



15. Sachs D. H., Schechter A. N., Cohen I. S. Nuclear magnetic resonance titration curves of histidine ring protons. I. Influence of neighboring charged groups.— *J. Biol. Chem.*, 1971, v. 246, № 21, p. 6576–6580.
16. Carlisle C. H., Palmer R. A., Mazumdar S. K., Gorinsky B. A., Yeates D. G. R. The structure of ribonuclease at 2,5 Angstrom resolutions.— *J. Mol. Biol.*, 1974, v. 85, № 1, p. 1–18.
17. Wyckoff H. W., Tsernoglou D., Hanson A. W., Knox J. R., Lee B., Richards F. M. The three-dimensional structure of ribonuclease-S. Interpretation of an electron density map at a nominal resolution of 2 Å.— *J. Biol. Chem.*, 1970, v. 245, № 2, p. 305–328.
18. Richards F. M., Wyckoff H. W. Atlas of molecular structure in biology. I. Ribonuclease S. (Phillips D. C., Richards F. M., eds). Oxford: Clarendon Press, 1973.
19. Yakovlev G. I., Karpeisky M. Ya., Bezborodova S. I., Beletskaja O. P., 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.
20. Lee B., Richards F. M. The interpretation of protein structures: estimation of static accessibility.— *J. Mol. Biol.*, 1971, v. 55, № 2, p. 379–400.
21. Patel D. I., Canuel L. L., Woodward C., Bovey F. A. Assignment of the histidine 12–threonine 45 hydrogen-bonded proton in the NMR spectrum of ribonuclease A in H<sub>2</sub>O.— *Biopolymers*, 1975, v. 14, № 5, p. 959–974.
22. del Rosario E. I., Hammes G. G. Kinetic and equilibrium studies of the ribonuclease-catalysed hydrolysis of uridine 2',3'-cyclic phosphate.— *Biochemistry*, 1969, v. 8, № 5, p. 1884–1889.
23. Witzel H., Barnard E. A. Mechanism and binding sites in the ribonuclease reaction. I. Kinetic studies on the second step of the reaction.— *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 1962, v. 7, № 4, p. 289–294.
24. Witzel H. The function of the pyrimidine base in the ribonuclease reaction.— In: *Prog. in Nucl. Acids Res. and Mol. Biol.* (Davidson T. N., Cohn W. E., eds). New York—London: Acad. Press, 1963, v. 2, p. 221–238.
25. Buchner P., Blomberg F., Ruterjans H. Nitrogen-15 nuclear magnetic resonance spectroscopy of <sup>15</sup>N-labeled nucleotides.— In: *Nuclear magnetic resonance spectroscopy in Mol. Biol.* (Pulman B., Reidel D., eds). Dordrecht, Holland: Publishing Company, 1978, p. 53–70.
26. Gassen H. G., Witzel H. Zum Mechanismus der Ribonuclease Reaktion. I. Die Aufgabe der Pyrimidin bei der Reaktion.— *Eur. J. Biochem.*, 1967, v. 4, № 1, p. 36–45.
27. Letters R., Michelson A. M. Polynucleotides. Part III. Synthesis of some polyuridylic acid analogues and a survey of anhydride reagents.— *J. Chem. Soc.*, 1962, № 1, p. 71–78.
28. Ruterjans H., Haar W., Maurer W., Thompson I. C. Calorimetric investigation of the interaction of inhibitors and substrates with ribonuclease A and ribonuclease T<sub>1</sub>. *Proc. I Int. Biophys. Congr.* Wien: Verlag der Wiener Medizinischen Academie, 1971, v. 4, p. 375–379.
29. Михайлов С. Н., Колбушкина Л. И., Крицын А. М., Паёлюкова Н. Ш., Флоренгель В. Л. Негликозидные аналоги нуклеотидов. Сообщение 3. Окспалдийные производные нуклеиновых оснований.— *Изв. АН СССР. Сер. хим.*, 1974, вып. 11, с. 2582–2588.
30. Markley J. L. Nuclear magnetic resonance studies of trypsin inhibitors. Histidines of virgin and modified soybean trypsin inhibitor (Kunitz).— *Biochemistry*, 1973, v. 12, № 12, p. 2245–2250.

Поступила в редакцию  
29.VIII.1980

## STRUCTURE OF RIBONUCLEASE A COMPLEXES WITH PYRIMIDINE NUCLEOTIDES IN SOLUTION

KARPEISKY M. YA., YAKOVLEV G. I., SAKHAROVSKY V. G.

*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*

The formation and some properties of complexes between ribonuclease A and pyrimidine nucleotides in solution were studied by NMR. The pH-dependences of chemical shifts of C2-, C4- and N1-protons of His<sup>12</sup> and His<sup>119</sup> were analyzed. The results indicated that immediate environment of His<sup>22</sup> differs in the enzyme complexes with the cytidine and uridine derivatives. The difference was attributed to identical disposition of proton-accepting and proton-donating groups of the nucleobase. The model for the structure of enzyme-substrate productive complex was proposed. The essential feature of the model is a network of identical hydrogen bonds between the enzyme and the nucleobase of a substrate, which should be fixed in the lactim form.