



УДК 577.155 : 543.422.23

ИССЛЕДОВАНИЕ ГУАНИЛСПЕЦИФИЧНОЙ РИБОНУКЛЕАЗЫ  
ИЗ ГРИБА *PENICILLIUM BREVICOMPACTUM*  
МЕТОДОМ ЯМР

*Карнейский М. Я., Яковлев Г. И.*

*Институт молекулярной биологии Академии наук СССР, Москва*

*Ботт В.*

*Институт молекулярной биологии Словацкой Академии наук, Братислава*

*Ежов В. А., Приходько А. Г.*

*Институт биохимии и физиологии микроорганизмов  
Академии наук СССР, Пушчино-на-Оке*

Исследована топохимия активного центра РНКазы *Penicillium brevicomcompactum* методом ЯМР. Изучена рН-зависимость химических сдвигов протонов гистидиновых остатков РНКазы, определены константы ионизации имидазольных групп остатков гистидина и ионогенных групп их ближайшего окружения. Измерены константы скоростей дейтерообмена С2-протонов гистидиновых остатков. Показано, что два остатка гистидина, принадлежащие активному центру фермента, взаимодействуют в ионизованном состоянии с карбоксильными группами. Третий гистидиновый остаток находится на поверхности глобулы белка в нейтральном окружении и не принадлежит активному центру. Образование комплекса РНКазы с гуанозином, Guo-3'-P и Ino-3'-P сопровождается изменением химических сдвигов протонов ароматических групп белка и нуклеотида, а также изменением констант ионизации имидазольных и карбоксильных групп активного центра. Связывание гетероциклического основания нуклеотида индуцирует конформационный переход, следствием которого является изменение взаимной ориентации ионогенных групп активного центра. Фосфатная группа нуклеотида в моноанионной форме образует ионную пару с одним из гистидиновых остатков и водородную связь с остатком дикарбоновой кислоты.

В настоящее время все большее подтверждение получает концепция, согласно которой функциональная гомология ферментов обуславливает гомологию их первичной и третичной структуры. В связи с этим при изучении молекулярных основ специфичности действия рибонуклеаз представляется целесообразным сравнительное исследование стереохимии их активных центров.

Применение метода ЯМР для решения поставленной задачи позволило в ряде случаев выявить существенные черты строения активных центров данной группы ферментов [1-5]. Среди РНКаз, специфически узнающих определенное основание субстрата, большое внимание привлекают гуанилспецифичные РНКазы. Наибольшее число работ посвящено изучению РНКазы T<sub>1</sub>, продуцируемой *Aspergillus oryzae* [6]. Недавно мы провели исследование активного центра гуанилспецифичной РНКазы из *Penicillium crysogenum* методом ЯМР [5].

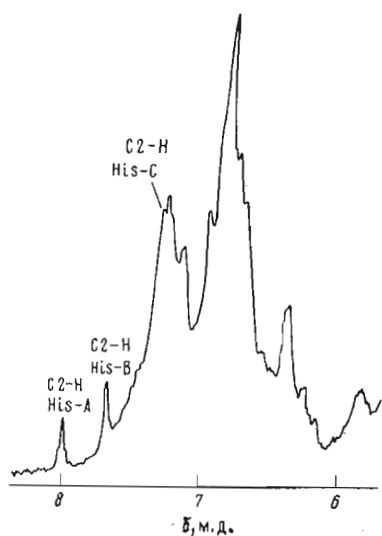


Рис. 1

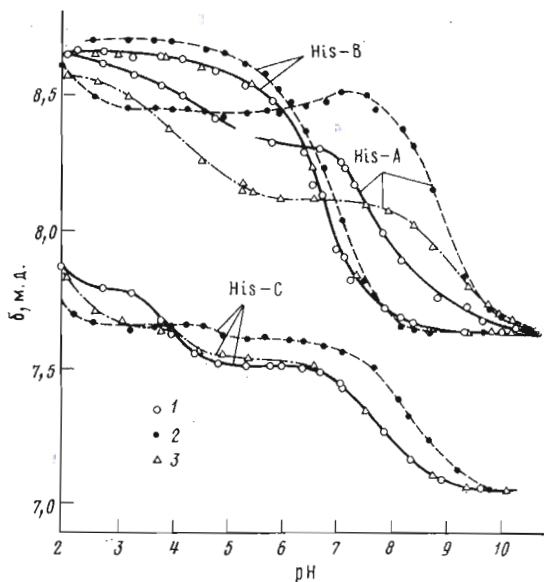


Рис. 2

Рис. 1. Ароматическая область спектра  $^1\text{H}$ -ЯМР РНКазы *P. brevicompactum* при рН 7,85

Рис. 2. рН-Зависимость химических сдвигов С2-протонов гистидиновых остатков РНКазы *P. brevicompactum* (1), ее комплекса с  $\text{Guo-3'-P}$  (2) и комплекса с гуанидином (3). Концентрация РНКазы  $3 \cdot 10^{-3}$  М, отношение нуклеозид — белок 4 : 1

В данной работе проведено изучение активного центра РНКазы из гриба *Penicillium brevicompactum*. Эта РНКаза имеет молекулярный вес и аминокислотный состав, близкие к соответствующим параметрам РНКазы  $T_1$ , и проявляет специфичность к гуаниновому основанию на 3'-конце гидролизуемой 3',5'-фосфодиэфирной связи в молекуле РНК. Фермент катализирует реакцию трансфосфорилирования 3'-концевых групп РНК, приводя к образованию олиго- и мононуклеотидов с 2',3'-циклофосфодиэфирными группами, которые в дальнейшем гидролизуются до соединений с 3'-фосфатом [7].

В молекуле РНКазы имеется три гистидиновых, шесть тирозиновых и пять фенилаланиновых остатков [8]. В спектре  $^1\text{H}$ -ЯМР РНКазы *P. brevicompactum* при рН 7,85 сигналы протонов тирозиновых, фенилаланиновых и С4-протонов гистидиновых остатков расположены в области 6,1—7,5 м. д., а сигналы С2-протонов гистидиновых остатков — в области 7,3—8,0 м. д. (рис. 1). Кроме того, в области выше 8,2 м. д. наблюдались сигналы пептидных NH-протонов белка, представленные уширенными сигналами с хим. сдвигами 8,76 и 9,10 м. д., которые исчезали, если фермент прогревали 3 мин при  $55^\circ\text{C}$  в  $^2\text{H}_2\text{O}$ .

При изучении рН-зависимости сигналов в ароматической части спектров  $^1\text{H}$ -ЯМР РНКазы *P. brevicompactum* были найдены пики, положение которых изменяется в области рН 5—8. Для идентификации сигналов С2-протонов гистидиновых остатков была исследована зависимость интенсивности пиков ЯМР в ароматической области спектра от времени инкубации фермента в  $^2\text{H}_2\text{O}$  при рН 8,3 и  $37^\circ\text{C}$ . В этих условиях на дейтерий обмениваются только С2-протоны гистидиновых остатков [9—10]. В исследуемой области спектра имеется три однопротонных сигнала, интенсивность которых уменьшается по мере инкубации фермента в  $^2\text{H}_2\text{O}$ . Период полуобмена протонов, соответствующих этим сигналам и отнесенных к С2-протонам имидазольных колец гистидиновых остатков (His-A, His-B и His-C на рис. 1), на дейтерий при указанных условиях составлял

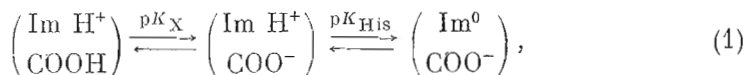
Кинетические константы дейтеробмена С2-протонов  
имидазольных колец гистидиновых остатков РНКазы  
*Penicillium brevicompactum* при pH 8,3 и 37° С

Гистидиновый остаток	Период полуобмена, сут	Константа псевдопервого порядка, $10^6 \text{ с}^{-1}$	$k_0, \text{ с}^{-1}$
His-A	0,8	10,5	14,7
His-B	3,8	2,1	46,0
His-C	3,0	2,7	5,2

для His-A около 0,8 сут, для His-B — 3,8 сут и для His-C — 3,0 сут (табл. 1).

На рис. 2 приведены pH-зависимости химических сдвигов С2-протонов гистидиновых остатков РНКазы *P. brevicompactum*. Параметры, характеризующие эти зависимости, найденные методами математического анализа [11, 12], даны в табл. 2. К ним относятся рК ионогенных групп, определяющих зависимость химических сдвигов С2-протонов имидазольных колец гистидиновых остатков, и химические сдвиги С2-протонов, соответствующие определенным ионным состояниям указанных групп. Для выявления характера белкового окружения гистидиновых остатков было проведено сопоставление этих параметров с соответствующими данными для С2-протонов N-ацетил-L-гистидинметиламида. Это соединение, рассматриваемое в качестве модели экспонированного в растворителе остатка гистидина в белке, имеет рК 6,38, а химические сдвиги его С2-протонов имидазольного кольца равны 8,65 и 7,66 м. д. для протонированной и нейтральной форм соответственно [13].

Из трех остатков гистидина РНКазы *P. brevicompactum* только для His-B значения рК и химических сдвигов близки соответствующим параметрам N-ацетил-L-гистидинметиламида. На кривой pH-зависимости химических сдвигов His-A проявляется влияние группы с рК 4,28, а для His-C — 3,85. Эти зависимости были проанализированы в соответствии с моделью:



где X — катионная группа белка.

Собственные значения рК гистидиновых остатков His-A и His-C, равные 8,05 и 7,85 соответственно (табл. 2), заметно превышают значение рК N-ацетил-L-гистидинметиламида. Вероятнее всего, это следствие влияния отрицательных зарядов близко расположенных карбоксильных групп. Химический сдвиг С2-протонов His-A в состоянии  $(\text{ImH}^+, \text{COOH})$  близок к соответствующему значению для протонированной формы N-ацетил-L-гистидинметиламида, а в состоянии  $(\text{Im}^0, \text{COO}^-)$  — к значению химического сдвига N-ацетил-L-гистидинметиламида в нейтральной форме. Переход  $(\text{ImH}^+, \text{COOH}) \rightarrow (\text{ImH}^+, \text{COO}^-)$  вызывает сдвиг сигнала С2-протонов на 0,27 м. д. в сильное поле.

Ранее было показано, что появление заряженной группы вблизи имидазольного кольца гистидина не влияет непосредственно на величину химических сдвигов его протонов, а оказывает влияние только на значение рК [13]. Поэтому близкие значения химических сдвигов С2-протонов His-A в состояниях  $(\text{ImH}^+, \text{COOH})$  и  $(\text{Im}^0, \text{COO}^-)$  к соответствующим значениям для N-ацетил-L-гистидинметиламида и сдвиг сигналов С2-Н His-A в сильное поле в состоянии  $(\text{ImH}^+, \text{COO}^-)$  свидетельствуют о сближении  $\text{ImH}^+$  и  $\text{COO}^-$  скорее всего за счет электростатического взаимодействия, приводящего к непосредственному влиянию карбоксильной группы

Константы ионизации некоторых ионогенных групп РНКазы *Penicillium brevicompactum* и ее комплексов с Guo и Guo-3'-P, рассчитанные из кривых ЯМР-титрования

Препарат	Пик в спектре ЯМР	pK	Коэффициент Хилла	$\delta^+$	$\delta^0$	$\delta^+ - \delta^0$
РНКаза	C2-H His-A	4,28±0,03 (pK <sub>X</sub> ) 8,05±0,02	0,98±0,01 0,98±0,02	8,61±0,01 8,31±0,01	8,34±0,01 7,68±0,01	0,27±0,02 0,63±0,02
	C2-H His-B	6,68±0,03	0,92±0,04	8,63±0,03	7,64±0,03	0,99±0,06
	C2-H His-C	3,85±0,03 (pK <sub>X</sub> ) 7,85±0,03	0,98±0,02 0,98±0,02	7,80±0,01 7,50±0,01	7,50±0,01 7,05±0,01	0,30±0,02 0,45±0,02
Комплекс РНКазы с Guo-3'-P	C2-H His-A	6,63±0,10 (pK <sub>X</sub> ) 8,90±0,02	1 * 1,02±0,03	8,43±0,01 8,51±0,02	8,51±0,01 7,61±0,02	-0,08±0,02 0,90±0,04
	C2-H His-B	6,88±0,04	0,94±0,07	8,66±0,05	7,63±0,05	1,03±0,10
	C2-H His-C	4,75±0,02 (pK <sub>X</sub> ) 8,30±0,04	1 * 0,98±0,02	7,67±0,01 7,61±0,02	7,61±0,01 7,05±0,02	0,06±0,02 0,56±0,04
	C8-H Guo-3'-P	9,50±0,05	1 *	8,12±0,01	7,88±0,01	0,24±0,02
	<sup>31</sup> P Guo-3'-P	3,05±0,06 (pK <sub>X</sub> ) 6,63±0,03	1,01±0,03 1,00±0,04	0,06±0,01 1,16±0,02	1,14±0,02 4,10±0,02	-1,19±0,04 -2,94±0,04
Комплекс РНКазы с Guo	C2-H His-A	4,10±0,10 (pK <sub>X</sub> ) 9,10±0,03	0,78±0,02 0,98±0,02	8,58±0,02 8,12±0,02	8,12±0,02 7,67±0,02	0,46±0,04 0,45±0,04
	C2-H His-C	4,25±0,08 (pK <sub>X</sub> ) 7,85±0,03	1 * 0,98±0,02	7,66±0,02 7,52±0,01	7,54±0,02 7,05±0,01	0,12±0,04 0,47±0,02

\* Коэффициент Хилла при расчете принят равным 1.

на химический сдвиг C2-протонов His-A (за счет влияния анизотропии химической связи между углеродом и кислородом).

Химические сдвиги C2-протонов His-C характеризуются аномально низкими значениями. Сдвиг сигналов этих протонов в сильное поле, по-видимому, обусловлен влиянием расположенных в непосредственной близости ароматических колец тирозиновых или фенилаланиновых остатков. Кривая pH-зависимости химических сдвигов C2-протонов His-C, как и в случае His-A, отражает влияние карбоксильной группы с pK 3,85. Ионизация этой группы вызывает сдвиг сигнала в сильное поле на 0,30 м. д., т. е. примерно на такую же величину, как и ионизация карбоксильной группы, расположенной вблизи остатка His-A. Однако общее изменение химического сдвига C2-протонов His-C при переходе от pH 3 к pH 10 составляет 0,75 м. д., что примерно на 0,25 м. д. меньше, чем соответствующее значение для His-A, His-B и N-ацетил-L-гистидинметиламида. Это свидетельствует о том, что влияние соседних ароматических остатков на химический сдвиг His-C различно для его ионизованной и нейтральной форм, т. е. различна их взаимориентация. При pH < 2,5 химический сдвиг протонов His-C возрастает, имея тенденцию к «нормализации». Возможно, это следствие частичного разворачивания глобулы белка.

Локализация His-C вблизи ароматических аминокислотных остатков должна приводить к ограничению доступности его имидазольного кольца растворителю. Это подтверждается данными протон-дейтериевого обмена C2-протонов. При изучении модельных соединений имидазола было установлено, что механизм обмена может быть описан реакцией псевдопервого порядка, константа скорости которой определяется уравнением [9, 10]:

$$k_{\text{набл}} = \frac{k_a [{}^2\text{H}_2\text{O}] \cdot [{}^2\text{H}^+] + k_b K_w}{K_a + [{}^2\text{H}^+]}, \quad (2)$$

где  $K_a = [\text{Im}] \cdot [{}^2\text{H}^+] / [\text{Im}^2\text{H}^+]$ ,  $K_w = [{}^2\text{H}^+] \cdot [{}^2\text{O}^{\text{H}^-}]$ ,  $k_a$  и  $k_b$  — константы скорости для реакции, катализируемой  ${}^2\text{H}_2\text{O}$  и  ${}^2\text{O}^{\text{H}^-}$  соответственно.

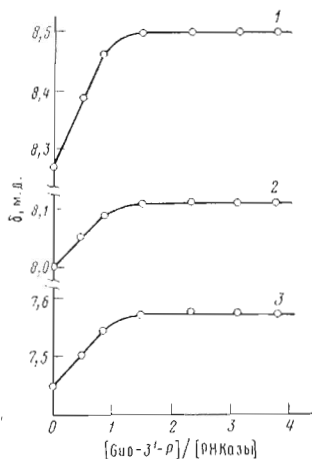


Рис. 3

Рис. 3. Изменение химических сдвигов C2-протонов His-A (1), His-B (2) и His-C (3) в зависимости от отношения Guo-3'-P – РНКазы при рН 6,96

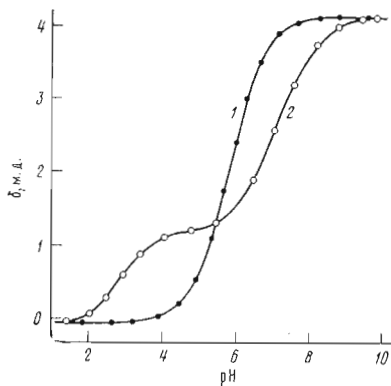


Рис. 4

Рис. 4. рН-Зависимость химических сдвигов  $^{31}\text{P}$  Guo-3'-P в растворе (1) и в комплексе с РНКазой (2)

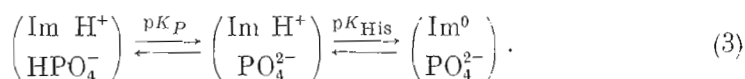
Отношение  $k_a/k_b \geq 10^9$  [14]; следовательно,  $k_a[\text{H}_2\text{O}] \cdot [\text{H}^+] \ll k_b K_w$  при  $\text{pH} > 8,0$ . Тогда, используя ранее найденные значения периода полуобмена протонов и  $\text{pK}$  гистидиновых остатков, можно определить соответствующие значения  $k_b$ . Было найдено, что  $k_b$  для His-A, His-B и His-C составляют 14,7; 46,0 и 5,2  $\text{с}^{-1}$  (табл. 1). Значение  $k_b$  для N-ацетилгистидина, равное 38  $\text{с}^{-1}$  [14], можно принять за значение константы скорости реакции псевдопервого порядка дейтерообмена для гистидинового остатка, полностью доступного растворителю. Из табл. 1 видно, что из трех гистидиновых остатков РНКазы *P. brevicompactum* только His-B полностью доступен растворителю. Обмен C2-протонов His-A и His-C происходит со скоростями более медленными, чем для His-B. Причиной этого может быть наряду со стерическими ограничениями доступности имидазольных колец His-A и His-C влияние отрицательных зарядов близко расположенных карбоксильных групп, ограничивающих доступность  $\text{O}^2\text{H}^-$ -ионов [10]. Однако значительно меньшая величина  $k_b$  для His-C по сравнению с His-A говорит о том, что His-C менее доступен растворителю.

Утверждение, что имидазольное кольцо His-B полностью доступно растворителю, требует объяснения различия величин  $\text{pK}$  этого гистидинового остатка и N-ацетил-L-гистидинметиламида. Следует отметить, что равное по величине различие  $\text{pK}$  наблюдалось ранее для N-ацетил-L-гистидинметиламида и His-105 РНКазы А – гистидинового остатка, расположенного на поверхности глобулы белка и не испытывающего влияния близлежащих зарядов [14]. Вероятнее всего, увеличение  $\text{pK}$  указанных гистидиновых остатков белка по сравнению с модельным соединением в растворе обусловлено уменьшением диэлектрической проницаемости среды на поверхности белковой глобулы. Уменьшение величины диэлектрической проницаемости увеличивает энергию, необходимую для разделения ионов, и соответственно повышает  $\text{pK}$ . Таким образом, значение  $\text{pK}$  6,7, по-видимому, является нормальным значением для гистидинового остатка белка, находящегося в нейтральном белковом окружении.

Образование комплекса РНКазы *P. brevicompactum* с Guo-3'-P сопровождается изменением в спектре ЯМР положений сигналов C2-протонов всех гистидиновых остатков. Из зависимости химических сдвигов C2-протонов от соотношения нуклеотид – белок можно заключить, что образующийся комплекс имеет состав 1:1 (рис. 3). Влияние комплексообразова-

ния на  $pK$  имидазольного кольца His-B незначительно, тогда как для His-A и His-C величины  $pK$  возрастают и ранее наблюдавшееся аннотропное влияние карбоксильных групп исчезает (рис. 2, табл. 2). По-видимому, His-B не принадлежит активному центру фермента. Наблюдающиеся небольшие изменения химических сдвигов при комплексобразовании с нуклеотидом отражают конформационные изменения белка, не затрагивающие His-B непосредственно.

В случае His-A  $pH$ -зависимость химических сдвигов протонов не может быть описана в рамках модели двух состояний имидазольного кольца из-за влияния на химический сдвиг С2-протонов ионизации группы с  $pK$  6,63. Очевидно, что этой группой является фосфатная группа нуклеотида, которая, согласно нашим данным, для Guo-3'-P в комплексе с РНКазой *P. brevicompactum* имеет  $pK$  6,63 (рис. 4, табл. 2). Высокое значение  $pK$  His-A в этом случае, по-видимому, обусловлено в первую очередь влиянием отрицательного заряда фосфатной группы. Зависимость химических сдвигов С2-протонов в комплексе РНКазы — Guo-3'-P описывается схемой



Когда фосфатная группа нуклеотида в комплексе находится в моноанионном состоянии, химический сдвиг С2-протонов His-A равен 8,43 м.д., т. е. сигнал С2-протонов сдвинут в сильное поле на 0,2 м.д. по отношению к сигналу протонов ImH<sup>+</sup> «нормального» His-B. Вторичная ионизация фосфатной группы приводит к сдвигу протонов His-A в слабое поле на 0,08 м.д. Поскольку депротонирование имидазольного кольца His-A происходит в области  $pH$ , где фосфатная группа нуклеотида существует в дианионном состоянии, наблюдаемое высокое значение  $pK$  His-A, превышающее «нормальное» ( $pK$  6,7) на 2,2 ед.  $pH$ , должно быть обусловлено влиянием дианиона фосфатной группы. Анализ полученных экспериментальных данных показывает, что в комплексе РНКазы *P. brevicompactum* с Guo-3'-P имидазольное кольцо His-A находится в контакте с фосфатной группой нуклеотида.

Образование комплекса фермента с гуанозином также существенно сказывается на  $pH$ -зависимости химических сдвигов С2-протонов His-A (рис. 2). Влияние ионогенной группы с  $pK \sim 4,3$  на химические сдвиги сохраняется, однако  $\Delta\delta$ , обусловленное титрованием этой группы, увеличивается до 0,45 м.д. по сравнению со значением 0,27 м.д. для свободного фермента. При этом коэффициент Хилла той части кривой, которая обусловлена титрованием этой кислой группы, заметно отличается от единицы, указывая на вклад более чем одной титрующейся группы. Величина  $pK$  имидазольного кольца His-A увеличивается более чем на 1  $pH$  по сравнению с его значением в свободном ферменте и превышает на 2,4 единицы  $pK$  «нормального» гистидинового остатка в белке ( $pK$  His-B), достигая величины, наблюдаемой в комплексе фермента с дианионной формой нуклеотида. Таким образом, становится очевидным, что в комплексе РНКазы *P. brevicompactum* с гуанозином фиксируется такая конформация активного центра, в которой вблизи His-A располагаются две карбоксильные группы с близкими значениями  $pK$ . Будучи ионизованными при  $pH > 3$ , эти группы оказывают влияние как на химический сдвиг С2-протонов ImH<sup>+</sup> остатка His-A, так и на константу его ионизации.

Рассмотрим теперь  $pH$ -зависимости С2-протонов His-C в комплексах РНКазы *P. brevicompactum* с Guo-3'-P и гуанозином. Анализ кривой  $pH$ -зависимости химических сдвигов С2-протонов His-C в комплексе с Guo-3'-P показывает, что на константу ионизации этого остатка влияет группа с  $pK$  4,75, причем присутствие этой группы лишь незначительно ( $\sim 0,05$  м.д.) сказывается на хим. сдвиге С2-протонов протониро-



Константы ингибирования реакции гидролиза Guo-P-Cyd  
РНКазой *Penicillium brevicompactum*  
(при pH 6,0 и 25° С)

Ингибитор	$K_i \cdot 10^5$ , М	Ингибитор	$K_i \cdot 10^5$ , М
Guo-2'-P	0,45	Ino-3'-P	170
Guo-3'-P	1,9	Ado-3'-P	400
Guo	29		

ванного имидазольного кольца остатка His-C, тогда как рК остатка His-C возрастает до 8,30. Можно полагать, что это возрастание по сравнению с рК остатка His-C свободного белка обусловлено отрицательным зарядом фосфатной группы. В комплексе с гуанозином рК остатка His-C не изменяется, однако рК кислой титрующейся группы, влияющей на химический сдвиг С2-протонов, становится равной 4,25 (в свободном белке 3,85).

Одновременное влияние фосфатной группы нуклеотида на химический сдвиг и величину рК имидазольных колец His-A и His-C означает, что эти остатки пространственно сближены до расстояния не более 1 нм. Такого же порядка расстояние между ними должно быть и в свободном белке, если не предполагать крупномасштабных конформационных изменений в белке при комплексообразовании с нуклеотидом. Тогда отсутствие взаимного влияния на кривые титрования остатков His-A и His-C (равенство единице коэффициента Хилла для pH-зависимостей химических сдвигов С2-протонов His-A и His-C, табл. 2) показывает, что между ними расположена легко поляризуемая группа [5]. В свободном белке и в комплексе с гуанозином такой группой, судя по всему, является одна из карбоксильных групп, титрование которой влияет на химические сдвиги протонов His-A и His-C. В комплексе с Guo-3'-P это, очевидно, фосфатная группа нуклеотида.

Образование комплекса Guo-3'-P с белком повышает рК его фосфатной группы от 5,94 до 6,63 (рис. 4). Кроме того, на кривой pH-зависимости химических сдвигов фосфатной группы в комплексе проявляется влияние группы белка с рК 3,05, титрование которой сдвигает сигнал  $^{31}\text{P}$  в слабое поле на 1,2 м.д. Следовало бы ожидать, что отмеченное выше взаимодействие фосфатной группы Guo-3'-P с протонированными остатками His-A и His-C будет приводить к уменьшению ее рК. Наблюдаемое повышение рК фосфатной группы и изменение ее химического сдвига в комплексе определяется присутствием группы с рК 3,05 вблизи фосфатной группы нуклеотида. Вероятно, это та карбоксильная группа белка, которая влияла на химический сдвиг протонов His-A в свободном белке и при образовании комплекса с нуклеотидом была вытеснена фосфатной группой Guo-3'-P. Можно предположить, что взаимодействие между фосфатной группой и отрицательно заряженной группой с рК 3,05 осуществляется путем образования водородной связи, когда заряд моноанионной формы фосфатной группы нейтрализуется путем образования солевого мостика с положительно заряженным имидазольным кольцом His-A.

Чтобы выяснить характер взаимодействия основания нуклеотида с белком, были определены константы ингибирования различными лигандами реакции гидролиза Guo-P-Cyd (табл. 3). Все лиганды проявляли конкурентный тип ингибирования. При одинаковом положении фосфата наибольшее сродство наблюдалось для гуанинового основания, наименьшее — для аденинового. Это свидетельствует о наличии специфических взаимодействий между атомами гетероциклического основания нуклеотида и белком. Вероятнее всего, эти специфические взаимодействия реализуются

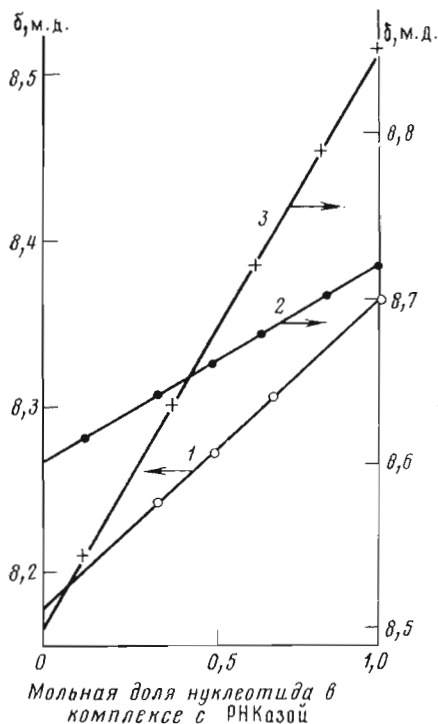


Рис. 5

Рис. 5. Зависимость химических сдвигов С8-протонов  $\text{Guo-3'-P}$  (1), С8- (2) и С2-протонов (3)  $\text{Ino-3'-P}$  от относительного количества нуклеотида, находящегося в комплексе с РНКазой, pH 6,96

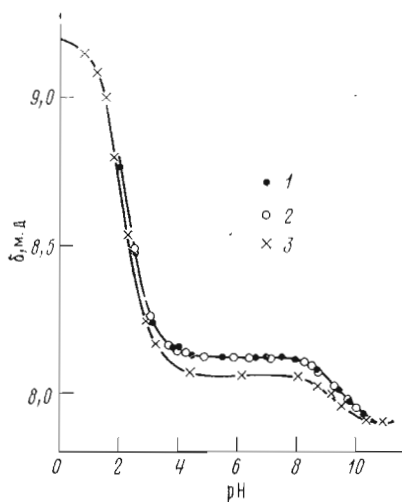


Рис. 6

Рис. 6. pH-Зависимость химических сдвигов С8-протонов гуанозина (1) и  $\text{Guo-3'-P}$  (2) в комплексах с РНКазой и  $\text{Guo-3'-P}$  в растворе (3)

путем образования водородных связей между донорно-акцепторными группами белка и гетероатомами основания. Сравнение констант ингибирования  $\text{Guo-3'-P}$  и  $\text{Ino-3'-P}$  показывает, что замена  $\text{NH}_2$ -группы во втором положении гетероциклического основания на атом водорода приводит к уменьшению сродства нуклеотида приблизительно в 100 раз. Существенным обстоятельством, определяющим специфичность взаимодействия гетероциклического основания нуклеотида с белком, является наличие амидного фрагмента, образуемого N1-H- и C6=O-группами нуклеотида. Наличие этого фрагмента — отличительный признак субстратов гуанил-специфичных РНКаз [6, 15]. Эффективность действия, например, гуанил-специфичной РНКазы  $T_1$  на динуклеозидмонофосфаты, содержащие инозин и аденозин, различается примерно в  $10^4$  раз [16], хотя сродство  $\text{Ino-3'-P}$  и  $\text{Ado-3'-P}$  к ферменту различается только в несколько раз [17, 18]. Эффективность действия гуанилспецифичных РНКаз на субстраты, содержащие аденозин, определяется, по-видимому, аминно-имино-таутомерным отношением для аденинового основания, величина которого составляет около  $10^4$  [19].

Дальнейшая информация о структуре комплекса нуклеотид — белок была получена при анализе химических сдвигов протонов нуклеотида ( $\text{Guo-3'-P}$  и  $\text{Ino-3'-P}$ ), находящегося в активном центре РНКазы *P. brevicompactum*. Химические сдвиги С8-протонов  $\text{Guo-3'-P}$  и  $\text{Ino-3'-P}$  в комплексе увеличиваются на 0,19 и 0,11 м. д. соответственно по сравнению со сдвигом в растворе (рис. 5). Изменение химического сдвига С8-протонов при комплексообразовании может быть обусловлено как анизотропным влиянием групп белка, так и изменением электронного состояния пири-



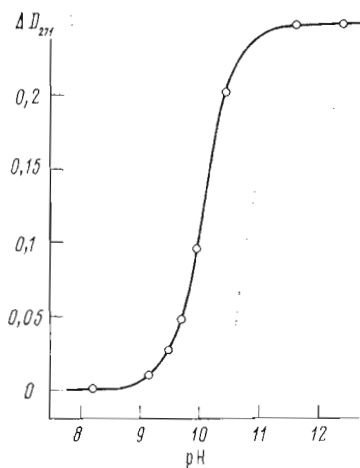


Рис. 7

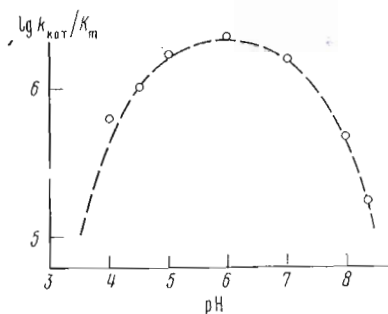


Рис. 8

Рис. 7. Изменение поглощения 7-дезаинозина в зависимости от pH

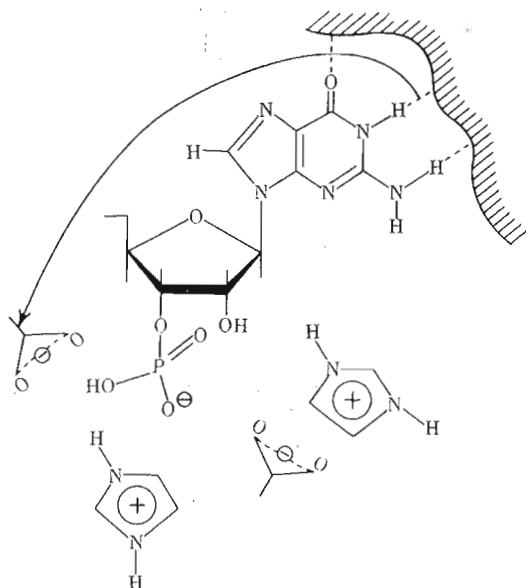
Рис. 8. Зависимость отношения  $k_{кат}/K_m$  от pH для РНКазы *P. brevicompactum* в реакции гидролиза Guo-P-Cyd (кружки); пунктирная линия соответствует той же реакции для РНКазы  $T_1$  [24]

мидинового кольца основания (рис. 6). Близкий по величине сдвиг С8-протона Guo-3'-P наблюдался ранее для комплекса нуклеотид — РНКазы  $T_1$  [4]. Было предположено, что он обусловлен образованием функционально важной водородной связи между белком и атомом N7 основания нуклеотида. Однако обоснованность такого предположения вызывает сомнения, так как рК протонирования N7-атома Guo-3'-P практически не изменяется при образовании комплекса с РНКазой *P. brevicompactum* (рис. 6) или с РНКазой  $T_1$  [4]. Тем не менее метилирование атома N7 основания нуклеотида или замена атома азота на атом углерода приводит к потере соответствующими нуклеотидами субстратных свойств [20, 21].

Ранее было показано, что эффективность протонодонорных свойств NH- и NH<sub>2</sub>-групп гуанинового основания существенно зависит от ионного состояния имидазольного кольца [22]. Кроме того, нами было найдено, что замена атома азота основания инозина в положении 7 на атом углерода приводит к существенному повышению константы ионизации пиримидинового кольца. Действительно, рК ионизации пиримидинового кольца инозина составляет 8,75 [15], а 7-дезаинозина — около 10,1 (рис. 7). Очевидно, это свидетельствует о преобладании лактимной таутомерной формы для пиримидинового кольца 7-дезаинозина. В связи с этим мы предположили, что отмеченная выше [20, 21] потеря субстратных свойств модифицированных по положению 7 гуанинового основания динуклеозид-фосфатов связана не с элиминированием функционально важной водородной связи между субстратом и белком, а с переводом субстрата в неактивную таутомерную форму, а именно в лактимную.

Сравнение pH-зависимостей химических сдвигов протонов His-A и His-C РНКазы *P. brevicompactum* и His-40 и His-92 РНКазы  $T_1$ , а также положения сигналов С8-протонов и <sup>31</sup>P-сигналов Guo-3'-P в комплексах с этими белками показывает, что они практически идентичны [4]. Близкими оказались также скорости обмена на дейтерий С2-протонов гистидиновых остатков His-A и His-40, His-C и His-92. Нам представлялось интересным сравнить кинетические характеристики обоих ферментов. Изучение методами стационарной кинетики pH-зависимости  $k_{кат}/K_m$  для РНКазы *P. brevicompactum* в реакции гидролиза Guo-P-Cyd показало, что она идентична аналогичной зависимости для РНКазы  $T_1$  (рис. 8). Полученные

результаты позволяют заключить, что, несмотря на различный аминокислотный состав этих двух гуанилспецифичных РНКаз, топохимия их активных центров, по-видимому, идентична. Вышеприведенные заключения о структуре комплекса РНКазы *P. brevicompactum* с Guo-3'-P суммированы схемой.



Схематическое изображение структуры комплекса РНКазы *P. brevicompactum* с Guo-3'-P; положение одной из карбоксильных групп активного центра определяется образованием водородных связей между гетероатомами нуклеинового основания и белком (показано стрелкой)

В заключение отметим следующее. Исходя из аналогии функций гуанилспецифичных РНКаз, можно ожидать сходства их общей третичной структуры и архитектуры активного центра. Исследования к настоящему времени гуанилспецифичные РНКазы имеют четко выраженную гомологию в аминокислотном составе [23]. Всем им присуще наличие четырех остатков полуцистеинов, которые, видимо, образуют два дисульфидных мостика, стабилизирующих структуру глобул. Значительное сходство между ними выявляется при изучении аминокислотных остатков, входящих в активные центры. Так, для РНКаз грибов *A. oryzae*, *A. clavatus*, *P. chrysogenum* и *Ustilago sphaerogena* было показано, что для проявления их активности очень важно присутствие в активном центре остатков двух гистидинов, одного аргининового остатка и одного остатка дикарбоновой кислоты [23]. Теперь имеется возможность сравнить результаты ЯМР-исследований трех гуанилспецифичных РНКаз: *A. oryzae* [4], *P. chrysogenum* [5] и *P. brevicompactum*. Общим для них является присутствие в активном центре двух гистидиновых остатков, один из которых экспонирован в растворитель, а другой менее доступен растворителю. Во всех РНКазах сигналы ЯМР С2-протонов этого гистидинового остатка находятся в аномально высоком магнитном поле. Это означает, что он находится в окружении ароматических аминокислотных остатков. На рН-зависимости химических сдвигов каждого из гистидиновых остатков активного центра проявляется влияние соседних с ними дикарбоновых кислот. В комплексах указанных РНКаз с Guo-3'-P легко доступный растворителю гистидиновый остаток взаимодействует с фосфатной группой нуклеотида и на рН-зависимости его протонов влияние дикарбоновой кислоты

исчезает. Наблюдается также полная аналогия для указанных трех РНКаз в отношении изменения химических сдвигов сигналов ЯМР С8-протонов и  $^{31}\text{P}$ -сигналов фосфатной группы  $\text{Guo-3}'\text{-P}$  при комплексообразовании его с белком. С8-протон испытывает низкочастотный сдвиг 0,2 м. д., а сигнал  $^{31}\text{P}$  фосфатной группы сдвигается в более слабое поле на  $\sim 1$  м. д. Во всех случаях рК фосфатной группы при комплексообразовании повышается, указывая на присутствие в ее непосредственной близости отрицательного заряда.

Таким образом, результаты ЯМР-исследования трех гуанилспецифичных РНКаз свидетельствуют о топохимическом сходстве их активных центров.

Авторы благодарят А. З. Гуревича (Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина АН СССР) за помощь в проведении на ЭВМ среднеквадратичного анализа кривых титрования, полученных методом ЯМР, и Е. Ю. Колбановскую (Институт молекулярной биологии АН СССР) за выполнение спектрофотометрического титрования 7-дезаинозина.

### Экспериментальная часть

В работе использовали свободную от фосфата и солей РНКазу *P. brevicompactum*, полученную как описано в работе [7].

Для ЯМР-измерений белок растворяли в  $^2\text{H}_2\text{O}$  (99,8%  $^2\text{H}_2\text{O}$ , «SIC», США) при рН 5,5. Растворы содержали белок в концентрации  $5 \cdot 10^{-3}$  М и 0,2 М NaCl. Величину рН устанавливали добавлением 0,3 М раствора  $^2\text{HCl}$  или  $\text{NaO}^2\text{H}$ . Измерение рН проводили микроэлектродами (Ingold) на рН-метре РНМ-62 (Radiometer, Дания). ЯМР-спектры были получены на спектрометре XL-100-15 (Varian, США) в режиме фурье-преобразования. Обычно проводилось 100–500 накоплений для получения спектра  $^1\text{H}$  и до 2000 скачиваний для  $^{31}\text{P}$ . Подавление сигнала  $\text{HO}^2\text{H}$  при получении спектров  $^1\text{H}$ -ЯМР осуществляли методом двойного резонанса. Все химические сдвиги в  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектрах дапы в миллионных долях относительно 2,2-диметил-2-силапентан-5-сульфоната натрия, а в спектрах  $^{31}\text{P}$ -ЯМР — относительно внешнего  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (85%). Спектры ЯМР регистрировали при 30° С. Дейтериевый обмен С2-протонов гистидиновых остатков проводили в 99,8%  $^2\text{H}_2\text{O}$  при рН 8,35 и 37° С. Интенсивность сигналов обменивающихся протонов измеряли при рН 4,3.

рК ионизирующихся групп из рН-зависимости химических сдвигов сигналов  $^1\text{H}$ - и  $^{31}\text{P}$ -ЯМР определяли, используя уравнение [12]

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

где  $\delta_{\text{набл}}$  — наблюдаемый химический сдвиг,  $\delta_0$  — химический сдвиг непротонированной формы,  $\Delta\delta$  — разность химических сдвигов протонированной и непротонированной форм,  $n$  — коэффициент Хилла.

Анализ выполняли на ЭВМ с использованием программы TTRM3B минимизацией суммы среднеквадратичных отклонений между экспериментальными и рассчитанными значениями, нормализованной на число точек и число варьируемых параметров.

Кинетические эксперименты были выполнены на спектрофотометре «Cary-118» при 25° С. Измерения проводили в трис-ацетатном буфере: 0,05 М трис, 0,05 М ацетат натрия и 0,1 М NaCl. Растворы приготавливали на бидистиллированной и деионизованной воде. Величину рН буфера устанавливали добавлением концентрированной уксусной кислоты. Концентрацию субстрата и ингибиторов определяли спектрофотометрически. Коэффициент молярной экстинкции для  $\text{Guo-P-Cyd}$  был принят равным  $1,26 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  при рН 7,0 и 25° С [24]. Начальные скорости определяли,

регистрируя увеличение поглощения при 280 нм за счет гидролиза динуклеозидфосфата, принимая  $\Delta\epsilon = 2,2 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$  [24]. Концентрация субстрата варьировалась от  $1,7 \cdot 10^{-5}$  до  $1,5 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ , а ингибиторов — от  $3 \cdot 10^{-6}$  до  $2 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ .

Было проверено изменение активности РНКазы *P. brevicompactum* после ЯМР-измерений. Образец РНКазы после ЯМР-титрования в диапазоне pH 1,8—9,4 полностью сохранял энзиматическую активность. При выдерживании образца в течение 40 мин при pH 10,0 потеря активности составляла около 10% от исходной. Выдерживание РНКазы при 55°С в течение 3 мин с последующим быстрым охлаждением до 20°С не изменяло активности фермента.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Meadows D. H., Roberts G. C., 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, № 3, p. 491—511.
2. 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.
3. Ruterjans H., Pongs O. On the mechanism of action of ribonuclease T<sub>1</sub>. Nuclear magnetic resonance study on the active site.— Eur. J. Biochem., 1971, v. 18, № 1, p. 313—318.
4. Arata Y., Kimura S., Matsuo H., Narita K. Proton and phosphorus nuclear magnetic resonance studies of ribonuclease T<sub>1</sub>.— Biochemistry, 1979, v. 18, № 1, p. 18—24.
5. Yakovlev G. I., Karpeisky M. Ya., Bezborodova S. I., Beletskaja O. P., Sakharovsky 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.
6. Uchida T., Egami F. Microbiol ribonucleases with special reference to RNases T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub>, N<sub>1</sub> and U<sub>2</sub>.— In: Enzymes /Ed. Boyer P. D. N. Y.: Acad. Press, 1971, v. 4, p. 205—250.
7. Безбородова С. И., Суходольская Г. В., Гуляева В. И., Ильина Т. В. Внеклеточная щелочная рибонуклеаза.— Прикл. биохим. и микробиол., 1974, т. 10, № 3, с. 432—437.
8. Bezborodov A. M., Bezborodova S. I., Grishenko V. M., Beletskaya O. P., Emelyanenko V. I. The compactive study of some fungal extracellular guanyloribonucleases.— In: Proceedings of the second international symposium on ribosomes and ribonucleic acid metabolism /Eds Zelinka J., Balan J. Bratislava: Publ. House of the Slovak Academy of Sciences, 1976, p. 165—178.
9. Vaughan J. D., Mughrabi Z., Wu E. C. The kinetics of deuteration of imidazole.— J. Org. Chem., 1970, v. 35, № 4, p. 1141—1145.
10. Bradbury J. H., Chapman B. E., Pellegrino F. A. Hydrogen-deuterium exchange kinetics of the C-2 protons of imidazole and histidine compounds.— J. Amer. Chem. Soc., 1973, v. 95, № 18, p. 6139—6140.
11. Shrager R. I., Cohen J. S., Heller S. R., Sachs D. M., Schechter A. N. Mathematical models for interacting groups nuclear magnetic resonance titration curves.— Biochemistry, 1972, v. 11, № 4, p. 541—547.
12. Markley J. L., Finkenshtadt 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.
13. Tonokura M., Tasumi M., Miyazawa T. <sup>1</sup>H nuclear magnetic resonance studies of histidine-containing di- and tripeptides. Estimation of the effects of charges groups on the pK value of the imidazole ring.— Biopolymers, 1976, v. 15, № 2, p. 393—401.
14. Markley J. L. Correlation proton magnetic resonance studies of 250 MHz of bovine pancreatic ribonuclease. I. Reinvestigation of the histidine peak assignments.— Biochemistry, 1975, v. 14, № 16, p. 3546—3554.
15. Irie S., Itoh T., Ueda T., Egami F. pH dependence of the RNase T<sub>1</sub> action on nucleoside 2',3'-cyclic phosphates.— J. Biochem. (Tokyo), 1970, v. 68, № 2, p. 163—170.
16. Walz F. G., Osterman H. L., Libertin C. Base-group specificity at the primary recognition site of ribonuclease T<sub>1</sub> for minimal RNA substrates.— Arch. Biochem. and Biophys., 1979, v. 195, № 1, p. 95—102.
17. Maurer W., Haar W., Ruterjans H. Calorimetric investigation of the interaction of inhibitors and substrates with ribonuclease A and ribonuclease T<sub>1</sub>.— First European biophysics congress, 14—17th September, 1971, Baden near Vienna, Austria, v. 4, p. 369—373.
18. Takahashi K. The structure and function of ribonuclease T<sub>1</sub>. XVIII. Gel filtration studies on the interaction of ribonuclease T<sub>1</sub> with substrate analogs.— J. Biochem. (Tokyo), 1972, v. 72, № 6, p. 1469—1481.

19. Cross D. G., Brown A., Fisher H. F. Hydrogen-deuterium exchange in nucleosides and nucleotides. Mechanism for exchange of the exocyclic amino hydrogens of adenosine.— *Biochemistry*, 1975, v. 14, № 12, p. 2745–2749.
20. Reese C. B., Sulston J. E. The methylation of guanylyl-(3'-5')-uridine.— *Biochim. et biophys. acta*, 1967, v. 149, № 2, p. 293–295.
21. Hashimoto J., Uchida T., Egami F. Action of ribonucleases T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub> and U<sub>2</sub> on dinucleoside monophosphates containing 7-deazapurine base.— *Biochim. et biophys. acta*, 1970, v. 199, № 3, p. 535–536.
22. McConell B. Exchange mechanisms for hydrogen bonding protons of cytidylic and guanylic acids.— *Biochemistry*, 1978, v. 17, № 15, p. 3168–3176.
23. Безбородова С. И., Безбородов А. М. Внеклеточные рибонуклеазы в сравнительном аспекте.— В кн.: Биосинтез микроорганизмами нуклеаз и протеаз. М.: Наука, 1979, с. 92–145.
24. 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, № 3, p. 558–564.

Поступила в редакцию  
11.III.1981

### NMR STUDY OF THE GUANYLSPECIFIC RIBONUCLEASE FROM *PENICILLIUM BREVICOMPACTUM FUNGI*

KARPEISKY M. Ya., YAKOVLEV G. I., BOTH V., EZHOV V. A.,  
PRIKHODKO A. G.

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

The topochemistry of *Penicillium brevicompactum* RNase active site has been studied by means of NMR technique. The ionization constants of the RNase histidines and neighbouring carboxy groups were estimated from the pH dependence of chemical shifts of histidine protons. The rate constants of the deuterium exchange were measured for the histidine C2-protons. Two histidines of the active site in ionized form interact with carboxyls, whereas the third histidine residue does not belong to the active site and is located on the protein surface in a neutral environment. A complex formation of the enzyme with Guo-3'-P gives rise to certain changes in the resonance position of protein aromatic protons and nucleotides protons, and affects ionization constants of histidine residues and carboxy groups of the active site. Interaction of the nucleobase with the enzyme induces a conformational change and a concomitant alteration of the mutual orientation of the active site ionizable groupings. The <sup>31</sup>P and <sup>1</sup>H NMR data suggest that the monoionized phosphate group of the nucleotide forms an ion pair with a histidine residue and a hydrogen bond with a carboxyl group.