



УДК 577.155.02

ИЗУЧЕНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ РОЛИ ГИСТИДИНА-101
РИБОНУКЛЕАЗЫ *BACILLUS INTERMEDIUS* 7P

Голубенко И. А., Лещинская И. Б.

Казанский государственный университет им. В. И. Ульянова-Ленина

Карпейский М. Я., Яковлев Г. И.

Институт молекулярной биологии Академии наук СССР, Москва

С помощью химической модификации диэтилпирокарбонатом изучена функциональная роль единственного гистидинового остатка РНКазы *B. intermedius* 7P. Карбэтоксигирование происходит селективно по остатку гистидина с pH-независимой константой скорости $20 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, причем модификация не приводит к структурным изменениям в молекуле фермента. Монокарбэтоксипроизводные РНКазы неактивны, но после дезацилирования гидроксиламином фермент полностью реактивируется. Показана принадлежность остатка His¹⁰¹ к каталитическому участку активного центра РНКазы и участие его в связывании фосфатной группы субстрата. В это связывание вовлекается один из атомов азота импдазольного цикла, который защищается лигандом при модификации в комплексе с 3'-GMP. Электростатическое взаимодействие остатка гистидина с отрицательно заряженной фосфатной группой субстрата вносит вклад в энергию взаимодействия при образовании фермент-субстратного комплекса. Наиболее вероятной причиной инактивации ацилированной РНКазы является понижение рК монокарбэтоксипроизводного остатка His¹⁰¹.

Внеклеточная РНКаза, продуцируемая споровыми бактериями вида *Bacillus intermedius* 7P (КФ 3.1.4.23), катализирует расщепление РНК и полирибонуклеотидов, образуя олигорибонуклеотиды с концевыми 2' : 3'-фосфатами [1, 2]. Если гидролизу подвергается РНК, то расщепление межнуклеотидных связей преимущественно происходит после остатков пуриновых нуклеозидов [1], тем не менее poly(U) и poly(C) наряду с poly(A) и poly(I) являются субстратами фермента [2]. При гидролизе динуклеозидфосфатов РНКазы *B. intermedius* 7P проявляет ярко выраженную специфичность к гуанозину на 3'-конце фосфодиэфирной связи [3]. Максимальная активность в гидролизе РНК фермент обладает при pH 8,5 [2], а в случае GrC — при pH 6,0 [3]. В молекуле РНКазы *B. intermedius* 7P имеется единственный остаток His¹⁰¹ [4], расположенный в активном центре фермента [3]. Предварительные эксперименты показали, что фермент весьма устойчив (время полуинактивации 50–100 ч) к действию иодацетата и иодацетамида при различных значениях pH, однако быстро инактивируется диэтилпирокарбонатом — широко применяемым гистидинацилирующим реагентом [5]. Поэтому именно он был выбран нами для изучения функциональной роли остатка гистидина в структуре и превращениях фермент-субстратных комплексов РНКазы *B. intermedius* 7P.

Кроме гистидина с диэтилпирокарбонатом в белках могут реагировать остатки тирозина, триптофана, цистеина, аргинина и лизина [5]. Чтобы определить, происходит ли в выбранных нами условиях модификация гистидина, аргинина или лизина (цистеин в составе РНКазы *B. intermedius* 7P отсутствует [4]), инактивированный фермент обрабатывали гидроксиламином. В результате реакции происходило дезацилирование гистидинового остатка, сопровождающееся практически полным восстановлением активности фермента. Поскольку остальные указанные остатки модифицируются диэтилпирокарбонатом необратимо [5], результаты проведенного эксперимента позволяют утверждать, что при обработке РНКазы *B. intermedius* 7P диэтилпирокарбонатом не происходит карбэтоксигирования функционально важных остатков лизина и аргинина. Инактивация фермента не сопровождается ацилированием тирозиновых остатков, так

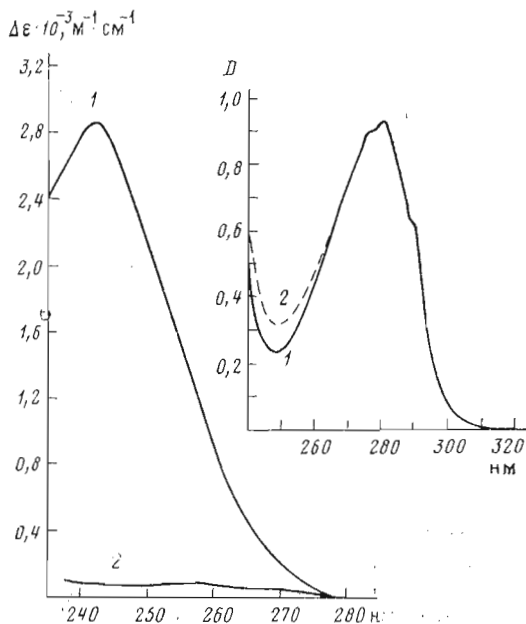


Рис. 1. Разностный спектр поглощения, возникающий при карбоксилровании РНКазы *B. intermedius* 7Р (0,1 М натрий-ацетатный буфер, рН 6,0; 25° С) (1) и ее последующего декарбоксилрования гидроксил-амином (2). Вставка: спектр поглощения нативной (1) и карбоксил-рованной (2) РНКазы. Концентрация фермента 41,3 мкМ, диэтилпирокар-боната — 0,41 мМ, условия те же

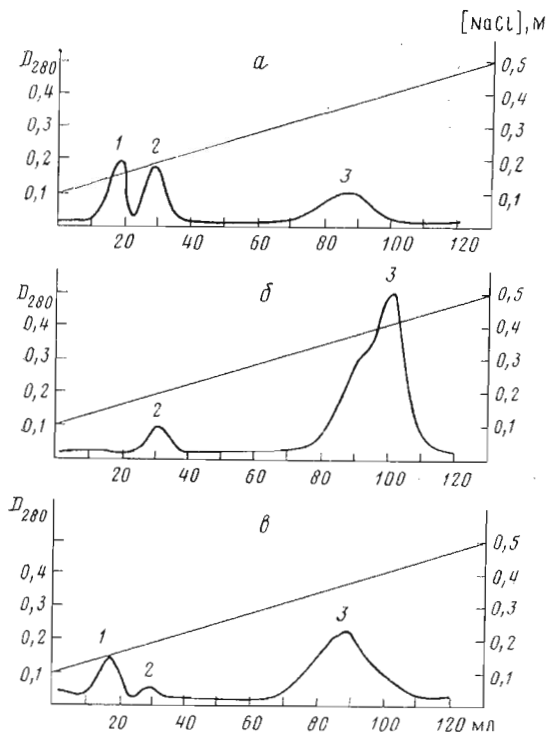


Рис. 2. Профиль хроматографического разделения продуктов модификации РНКазы *B. intermedius* 7Р диэтилпирокарбонатом в 0,1 М натрий-ацетатном буфере при рН 6,0 и 25° С (а), в тех же условиях, но в присутствии насыщающих концентраций 3'-GMP (б), в 0,1 М натрий-фосфатном буфере при рН 6,0 и 25° С (в). Колонка (0,9×10 см) с фосфоцеллюлозой Р-11, уравновешенной 0,1 М натрий-ацетатным буфером, рН 6,0; скорость элюции 16 мл/ч. В пиках 1 и 2 — монокарбоксилрованная РНКазы, в пике 3 — белок со 100% активности

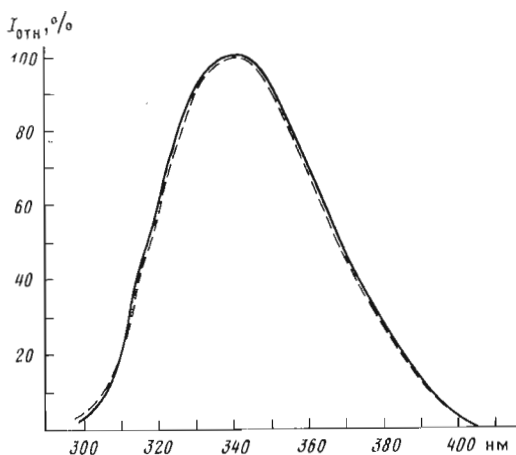


Рис. 3

Рис. 3. Спектры относительной интенсивности флуоресценции нативной (пунктирная линия) и карбэтоксилированной в 0,1 М натрий-ацетатном буфере, рН 6,0, РНКазы (сплошная линия). Ферментный раствор содержит 0,1 М NaCl в 0,1 М ацетатном буфере, рН 6,0

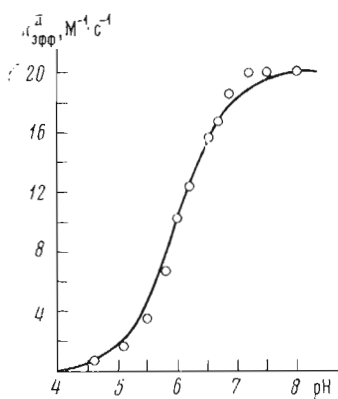


Рис. 4

Рис. 4. рН-Зависимость эффективных констант скорости второго порядка карбэтоксилирования РНКазы в 0,1 М натрий-ацетатном буфере при 25° С. Точками показаны экспериментальные значения $k_{эфф}^{II}$, теоретическая кривая соответствует значениям pK 6,0 и k^{II} 20 $M^{-1}s^{-1}$

как в разностном УФ-спектре модифицированного белка (рис. 1) отсутствуют сопровождающие образование О-карбэтоксилирозина изменения поглощения в области 278 и ниже 240 нм [5]. Таким образом, становится очевидным, что в выбранных условиях (0,1 М натрий-ацетатный буфер, рН 6,0) модификация подвергается только остаток гистидина. Положение и форма полосы в разностном УФ-спектре модифицированного и нативного фермента указывают на то, что продуктом реакции является монокарбэтоксипроизводное [5, 6]. Последующая обработка гидроксиламином в течение 15 мин инактивированного до 70% продукта приводила к полному восстановлению исходной активности и исчезновению разностного спектра ацилированного фермента (рис. 1). При попытке повысить выход модифицированного белка путем увеличения концентрации диэтилпирокарбоната указанная процедура приводила к восстановлению активности лишь на 80–85%, по-видимому, из-за образования заметных количеств белка с дикарбэтоксилированным остатком гистидина [6–8].

Гомогенные препараты модифицированной по гистидиновому остатку РНКазы *B. intermedius* 7Р были получены при хроматографии реакционной смеси на фосфоцеллюлозе Р-11. Как видно из рис. 2а, при элюции градиентом соли происходит эффективное разделение модифицированного (пики 1 и 2) и нативного (пик 3) фермента. Белки в пиках 1 и 2 обладали практически одинаковыми УФ-спектрами поглощения и активностью 0,6 и 0,8% соответственно. После обработки гидроксиламином активность белков обоих пиков восстанавливалась на 100%. Хроматографическое поведение модифицированной по гистидиновому остатку РНКазы указывало на то, что модификация, по-видимому, затрагивает фосфатсвязывающий участок белковой молекулы, взаимодействие которого с фосфатными группами ионообменника является определяющим при разделении на фосфоцеллюлозе. Очевидно, полученные фракции монокарбэтоксилированной РНКазы соответствуют двум разным продуктам, образующимся при ацилировании имидазольного кольца по атомам N(1) или N(3) [9]. Разделение этих продуктов на фосфоцеллюлозе обусловлено, вероятно, различной их способностью связываться с фосфат-ионами.

**Значения рН-независимых констант скорости ацилирования
некоторых производных имидазола**

Соединение	рК	k^{II} , М ⁻¹ с ⁻¹	Ссылка
Имидазол	7,0	54,2	[10]
Гистидин	6,0	7,7	[11]
РНКаза A His ¹²	6,3	6,7	[11]
His ¹⁰⁵	6,7	(для среднего значения рК 6)	
His ¹¹⁹	5,8		
Лактатдегидрогеназа	6,8	216	[12]
His ¹⁹⁵			

Как видно из рис. 1 (вставка), в УФ-спектрах нативного и модифицированного белка отсутствует разница в поглощении в области 280 нм, и, следовательно, модификация не влияет на окружение тирозиновых и триптофановых остатков фермента. Спектры флуоресценции нативной и модифицированной РНКазы (рис. 3) также идентичны, что согласуется со сделанным выводом. Таким образом, молярные коэффициенты поглощения нативного и модифицированного фермента при 280 нм имеют одинаковые значения, что позволяет построить разностный спектр, приведенный на рис. 1. Видно, что величина $\Delta\epsilon_{242}$, которой обычно пользуются для характеристики монокарботоксигистидина, в нашем случае равна $2850 \pm \pm 150 \text{ М}^{-1}\text{см}^{-1}$. Для расчетов мы применяли значение $\Delta\epsilon_{242} 2900 \text{ М}^{-1}\text{см}^{-1}$.

Известно, что имидазольное кольцо гистидина участвует в реакции карботоксилирования, находясь в непротонированной форме [10]. Следовательно, экспериментально определяемая константа скорости карботоксилирования, измеренная при фиксированном значении рН ($k_{эфф}^{II}$), является величиной кажущейся. Для того чтобы определить рН-независимую константу скорости, характеризующую реакционную способность гистидинового остатка РНКазы, была измерена рН-зависимость $k_{эфф}^{II}$ в интервале значений рН 4,7–8,0 (рис. 4). Анализ экспериментальных данных проводили, используя уравнение

$$k_{эфф}^{II} = k^{II} / (1 + [H^+] / K_a),$$

где $[H^+]$ — концентрация ионов водорода, K_a — константа диссоциации протонированного имидазола, k^{II} — рН-независимая константа скорости второго порядка.

Экспериментальные значения $k_{эфф}^{II}$ достаточно хорошо ($\pm 15\%$) согласуются с теоретическими, рассчитанными для рК $6,0 \pm 0,1$ и $k^{II} = 20 \pm 2 \text{ М}^{-1}\text{с}^{-1}$ (рис. 4). Найденное значение рК практически совпадает с измеренной ранее методом ЯМР величиной рК $6,25 \pm 0,04$ для РНКазы в растворе с более высокой ионной силой — 0,2 М NaCl [3]. Сопоставление полученного значения рН-независимой константы скорости ацилирования с аналогичными величинами для самого имидазола и его производных в других объектах (таблица) показывает, что His¹⁰¹ РНКазы *B. intermedius* 7Р обладает реакционной способностью того же порядка, что и свободный гистидин или имидазол, и скорее всего находится на поверхности белковой глобулы.

Необходимым этапом исследования является выяснение молекулярных причин, обуславливающих инактивацию фермента, и, в частности, вопроса о том, влияет ли модификация на образование и строение комплекса фермента с нуклеотидами. Разностные УФ-спектры, полученные при комплексообразовании карботоксилированных производных РНКазы (пик 1 и 2) с 3'-GMP, имеют характеристические точки при 290, 270 и 245 нм (максимум, плечо, минимум соответственно), т. е. качественно полностью идентичны соответствующему разностному спектру нативного белка (рис. 5). Небольшое различие в интенсивности поглощения в разностном спектре, наблюдаемое в области 290 и 275–260 нм не превышает 15%, а при 245 нм — менее 5%. Ранее было показано, что разностный спектр

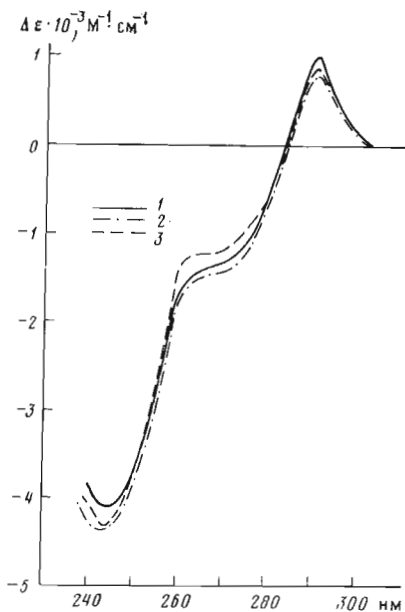


Рис. 5. Разностные УФ-спектры комплексов с 3'-GMP монокарбэтоксипроизводного РНКазы *B. intermedius* 7P из пика 1 (1) и пика 2 (2). Спектр (3) соответствует разностному спектру нативной РНКазы с 3'-GMP. 0,1 М NaCl в 0,1 М натрий-ацетатном буфере, pH 6,0 (25° С)

комплекса РНКазы *B. intermedius* 7P с 3'-GMP обусловлен взаимодействием с белком гуанинового основания нуклеотида [3]. Высокая степень сходства разностных спектров комплексов с 3'-GMP карбэтоксигированной и нативной РНКазы свидетельствует о том, что гистидиновый остаток скорее всего не участвует во взаимодействии белка с нуклеозидным фрагментом лиганда и его модификация практически не нарушает характер этого взаимодействия. Разностные УФ-спектры, возникающие при комплексобразовании, были использованы для определения константы ассоциации между модифицированным ферментом и 3'-GMP. Для этого измеряли зависимость интенсивности поглощения в разностном спектре от концентрации нуклеотида при постоянной концентрации белка (рис. 6). Анализ данных проводили по уравнению

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

где $K_{\text{асс}}$ — константа ассоциации, ΔD_{λ} — амплитуда разностного спектра поглощения на длине волны λ , $[E]_0$ и $[L]_0$ — исходные концентрации белка и лиганда [13].

Как видно из рис. 6, полученные экспериментальные данные наилучшим образом описываются при использовании значений $\Delta \epsilon_{245}$ 4100 и 4400 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ для карбэтоксипроизводных РНКазы, соответствующих пикам 1 и 2 на рис. 2а. Значение $\Delta \epsilon_{245}$ для комплекса нативной РНКазы составляет 4300 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [3]. Для определения стехиометрического состава комплексов использовали зависимость $[L]_0/[EL]$ от $[E]_0 - [EL]$ (рис. 6, вставка). Тангенс угла наклона равен $K_{\text{асс}}^{-1}$, а отсекаемый отрезок на оси ординат определяет количество молекул лиганда в комплексе [13]. Оба карбэтоксипроизводных РНКазы, как и нативный фермент [3], имеют один центр связывания 3'-GMP. Константы связывания составляют $4,4 \cdot 10^4$ и $5,3 \cdot 10^4$ M^{-1} для производных из пиков 1 и 2 соответственно. Для нативной РНКазы при pH 6,0 значение $K_{\text{асс}}$ $6,2 \cdot 10^5$ M^{-1} [3]. Таким образом, модификация не препятствует образованию комплекса фермента с нуклеотидом, но уменьшает его прочность. Приведенные значения константы ассоциации характеризуют взаимодействие нуклеотида с белком без учета того, в какой ионной форме находится гистидиновый остаток.

Поскольку разностные УФ-спектры комплексов модифицированного и нативного белка с 3'-GMP практически совпадают, а константы связывания различны, это означает, что нарушено взаимодействие между фосфорибозильным фрагментом лиганда и комплементарным ему локусом активного центра фермента. Наблюдаемый эффект обусловлен либо изме-

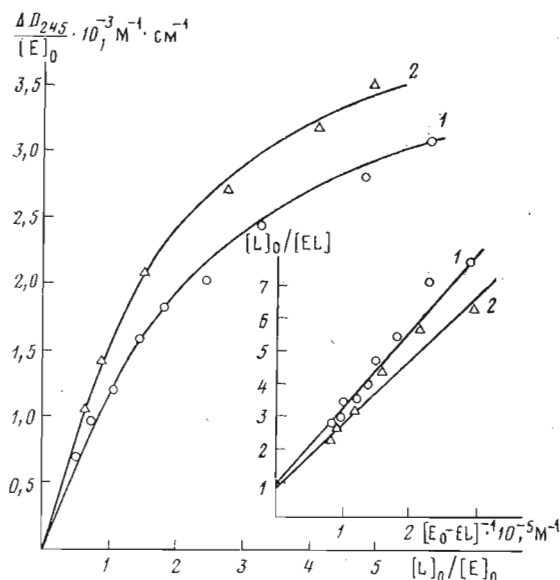


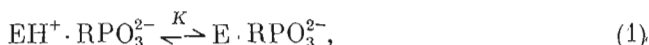
Рис. 6. Зависимость разностного молярного поглощения смеси 3'-GMP и продукта карбэтоксилирования РНКазы из пика 1 (1) и пика 2 (2) от отношения нуклеотид/белок. Концентрация РНКазы 13,6 мкМ (1) и 16 мкМ (2), 0,1 М натрий-ацетатный буфер, рН 6, содержащий 0,1 М NaCl (25° С). Точками показаны экспериментальные значения, линией — теоретическая кривая, соответствующая значениям $\Delta\epsilon_{245}$ 4100 $M^{-1}cm^{-1}$ и K_{acc} 4,4 · 10⁴ M^{-1} (1); $\Delta\epsilon_{245}$ 4400 $M^{-1}cm^{-1}$ и K_{acc} 5,3 · 10⁴ M^{-1} (2). Вставка: зависимость $[L]_0/[E]_0$ от $1/[E_0 - EL]$ для комплексов 3'-GMP с карбэтоксипроизводными РНКазы из пиков 1 (1) и 2 (2)

нением в результате модификации рК имидазольного цикла, либо непосредственным влиянием введенной карбэтоксигруппы. Таким образом, полученные результаты прямо указывают на то, что остаток His¹⁰¹ расположен в каталитическом участке активного центра фермента. Более того, можно думать, что в комплексе нативного белка с нуклеотидом положительно заряженный цикл His¹⁰¹ [3] непосредственно взаимодействует с фосфатной группой нуклеотида, так как уменьшение средства модифицированного фермента к нуклеотиду не зависит от того, ацилируется ли N(1) или N(3).

Хорошо согласуется со сделанным выводом и тот факт, что в комплексе модифицированного фермента с 3'-GMP имидазольный цикл His¹⁰¹ скорее всего находится в незаряженной форме. Действительно, рК His¹⁰¹ в комплексе нативной РНКазы *B. intermedius* 7P с 3'-GMP равно 7,54 ± 0,04, что на 1,3 единицы превышает соответствующую величину для свободного фермента [3]. Если подобное изменение рК имеет место при комплексообразовании модифицированного фермента с 3'-GMP, то ожидаемое значение рК карбэтоксилированного остатка гистидина РНКазы в комплексе будет около 4,1, так как карбэтоксилирование имидазола сопровождается уменьшением величины его рК на 3,4 единицы [10]. Следовательно, в условиях измерения K_{acc} (рН 6,0) гистидиновый остаток находится в депротонированном состоянии. Интересно, что при гидролизе GrС РНКазой *B. intermedius* 7P каталитическая активность фермента в щелочной области рН уменьшается пропорционально степени депротонирования гистидинового остатка [3]. Поэтому можно думать, что инактивирующее влияние карбэтоксилирования His¹⁰¹ РНКазы *B. intermedius* 7P в первую очередь определяется значительным уменьшением его константы ионизации.

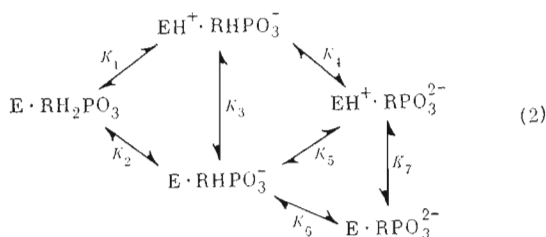
В свете полученных данных представлялось оправданным изучить модификацию диэтилпиروкарбонатом в присутствии таких лигандов, как 3'-GMP и неорганический фосфат. Было обнаружено, что форма разностного спектра поглощения, возникающего при карбэтоксилировании

РНКазы диэтилпирокарбонатом в присутствии насыщающих количеств 3'-GMP, такая же, как и в отсутствие лиганда. Следовательно, в условиях эксперимента гетероциклическое основание нуклеотида устойчиво к действию диэтилпирокарбоната [14], чего, вообще говоря, следовало ожидать, так как константа скорости ацилирования гуаозина на 4 порядка меньше константы скорости ацилирования гистидина [14]. Обработка модифицированного в присутствии 3'-GMP фермента гидроксиламином полностью восстанавливала его каталитическую активность. Вместе с тем было найдено, что константа скорости $k_{\text{эфф}}^{\text{II}}$ ацилирования РНКазы в присутствии 3'-GMP уменьшается пропорционально увеличению концентрации комплекса (рис. 7). Значение $k_{\text{эфф}}^{\text{II}}$ для белка в комплексе, полученное экстраполяцией $k_{\text{эфф}}$ на 100%-ное содержание комплекса, составляет $2 \pm 0,2 \text{ M}^{-1}\text{c}^{-1}$ при pH 6,0 и 25°С. Оценку величины k^{II} можно провести исходя из предположения, что модификации подвергается непротонированная форма His¹⁰¹ в комплексе, где лиганд существует в форме дианиона:



где K — константа кислотной диссоциации имидазольного кольца His¹⁰¹ в комплексе с дианионной формой нуклеотида. Используя значение pK $7,54 \pm 0,04$ [3], можно найти, что величина k^{II} в соответствии с уравнением (1) равна $71 \pm 19 \text{ M}^{-1}\text{c}^{-1}$, что существенно превышает k^{II} для свободного фермента.

Приведенная оценка является приближенной, поскольку в действительности в растворе комплекс фермента с нуклеотидом может существовать в различных ионных формах. Согласно работе [3], фосфатная группа нуклеотида в зависимости от pH может существовать в комплексе в виде моно- и дианиона. При этом, как следует из сопоставления pH-зависимостей положения сигналов ³¹P фосфатной группы и C2-протонов имидазольного кольца гистидинового остатка в спектрах ЯМР [3], а также результатов данной работы, комплекс РНКазы и 3'-GMP может существовать при отсутствии положительного заряда на имидазольном цикле. Поэтому состояние кислотного равновесия в системе белок—лиганд следует представить в виде более сложной схемы:



где K_2, K_3, K_4, K_6, K_7 — константы ионизации различных форм фермент-субстратного комплекса, K_1 и K_5 — константы равновесия реакций внутри-молекулярного переноса протона

$$\begin{aligned}
 K_1 &= \frac{[\text{EH}^+ \cdot \text{RHPO}_3^-]}{[\text{E} \cdot \text{RH}_2\text{PO}_3]}; & K_2 &= \frac{[\text{E} \cdot \text{RHPO}_3^-][\text{H}^+]}{[\text{E} \cdot \text{RH}_2\text{PO}_3]}; \\
 K_3 &= \frac{[\text{E} \cdot \text{RHPO}_3^-][\text{H}^+]}{[\text{EH}^+ \cdot \text{RHPO}_3^-]}; & K_4 &= \frac{[\text{EH}^+ \cdot \text{RPO}_3^{2-}][\text{H}^+]}{[\text{EH}^+ \cdot \text{RHPO}_3^-]}; \\
 K_5 &= \frac{[\text{E} \cdot \text{RHPO}_3^-]}{[\text{EH}^+ \cdot \text{RPO}_3^{2-}]}; & K_6 &= \frac{[\text{E} \cdot \text{RPO}_3^{2-}][\text{H}^+]}{[\text{E} \cdot \text{RHPO}_3^-]}; \\
 K_7 &= \frac{[\text{E} \cdot \text{RPO}_3^{2-}][\text{H}^+]}{[\text{EH}^+ \cdot \text{RPO}_3^{2-}]}.
 \end{aligned}$$

Для определения зависимости $k_{\text{эфф}}^{\text{II}}$ от pH мы приняли, что модификации будут подвергаться все формы фермент-субстратного комплекса с незаря-

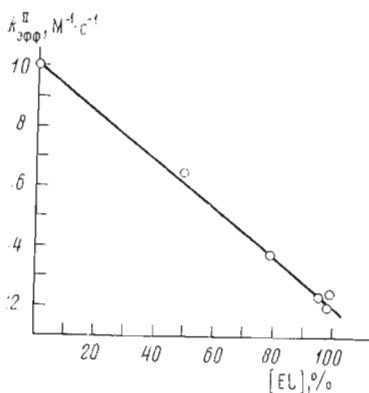


Рис. 7

Рис. 7. Зависимость константы скорости второго порядка $k_{эфф}^{II}$ ацилирования РНКазы в комплексе с 3'-GMP от содержания комплекса (0,1 М натрий-ацетатный буфер, pH 6,0, 25°С)

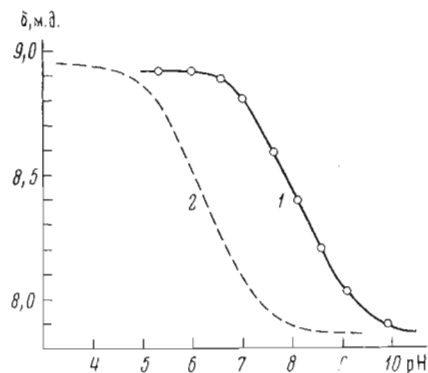


Рис. 8

Рис. 8. Зависимость химических сдвигов C2(H)-протонов His¹⁰¹ РНКазы *B. intermedius* 7P в 0,1 М KH₂PO₄ (1) и 0,2 М NaCl (2). Концентрация белка 3 мМ

женным имидазольным кольцом His¹⁰¹. Тогда уравнение зависимости $k_{эфф}^{II}$ от концентрации водородных ионов может быть записано в виде

$$k_{эфф}^{II} = k^{II} \frac{1 + [H^+]/K_2 + K_6[H^+]}{1 + [H^+]/K_2 + K_6/[H^+] + [H^+]/K_3 + 1/K_5} \quad (3)$$

Воспользуемся следующими соотношениями: $K_3 \cdot K_6 = K_4 \cdot K_7$, $K_3/K_4 = K_5$, $[H^+]/K_2 \ll 1$ при $pH \geq 6$. Тогда выражение (3) преобразуется:

$$k_{эфф}^{II} = k^{II} \frac{1 + K_4 \cdot K_7 / K_3 [H^+]}{1 + K_4 \cdot K_7 / K_3 [H^+] + [H^+] / K_3 + K_4 / K_3} \quad (4)$$

В работе [3] было найдено, что pK_4 и pK_7 равны $6,30 \pm 0,04$ и $7,54 \pm 0,04$ соответственно. Для pK_3 можно принять значение $7,0 \pm 0,1$, равное pK ионизации гистидина в комплексе РНКазы с моноанионом, найденное методами стационарной кинетики из зависимости K_m от pH для реакции гидролиза GrC [3]. С этими значениями констант ионизации из уравнения (4) можно найти $k^{II} = 29 \pm 13 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$. Таким образом, константы скорости ацилирования непротоциированной формы имидазольного кольца His¹⁰¹ РНКазы в комплексе с 3'-GMP и в растворе практически одинаковы. Это позволяет заключить, что доступность для ацилирования остатка His¹⁰¹ РНКазы *B. intermedius* 7P не изменяется при образовании комплекса с нуклеотидом.

Хроматографический анализ продуктов модификации диэтилпирокарбонатом комплекса РНКазы с 3'-GMP показал, что карбэтоксилирование имидазольного кольца осуществляется преимущественно по одному из атомов азота (рис. 2б). Селективность карбэтоксилирования атомов N(1) и N(3) гистидина свидетельствует об определенной ориентации имидазольного кольца относительно фосфатной группы нуклеотида.

Была исследована также кинетика ацилирования РНКазы *B. intermedius* 7P в 0,1 М фосфатном буфере, pH 6,0, поскольку предыдущие эксперименты показали, что фосфат обладает достаточно высоким сродством к активному центру фермента. Действительно, кажущаяся константа скорости ацилирования $k_{эфф}^{II}$ оказалась равной $0,76 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$, т. е. примерно в 13 раз ниже, чем в случае 0,1 М ацетатного буфера, pH 6,0. В то же время проверка показала, что константы скорости ацилирования гистидин-моногидрата в ацетатном и фосфатном буферах одинаковы. Очевидно, неорганический фосфат связывается с гистидиновым остатком РНКазы *B. intermedius* 7P подобно тому, как это наблюдалось в случае РНКазы А

[15]. Прямое подтверждение справедливости сделанного вывода было получено при изучении рН-зависимости ПМР-спектров фермента в 0,1 М фосфате. Как видно из рис. 8, присутствие в растворе фосфата повышает рК гистидинового остатка до 8,0, т. е. приблизительно на 1,8 единицы по сравнению с 0,2 М раствором NaCl [3]. Полученные данные не оставляют сомнения в том, что в условиях эксперимента действительно образуется комплекс между РНКазой *B. intermedius* 7P и ортофосфатом. Однако, как показал хроматографический анализ продуктов модификации в фосфатном буфере (рис. 2в), в комплексе с ортофосфатом преимущественно ацилируется тот атом азота имидазольного цикла, который защищается от модификации в комплексе с 3'-GMP (ср. рис. 2б). Это прямо указывает на ориентирующую роль нуклеотида в специфическом связывании реагирующего фрагмента субстрата, согласно предложенному ранее молекулярному механизму узнавания гидролитическими ферментами низкомолекулярных субстратов [16].

Таким образом, результаты данной работы показывают, что остаток His¹⁰¹, находящийся в активном центре РНКазы *B. intermedius* 7P, расположен на поверхности белковой глобулы, доступен ацилированию диэтилпирокарбонатом, причем модификация не приводит к структурным изменениям в молекуле фермента. Исследование модификации остатка His¹⁰¹ в комплексе с 3'-GMP и ортофосфатом подтверждает выдвинутое нами ранее предположение [3], что остаток His¹⁰¹ находится в каталитическом участке активного центра фермента. Очевидно, что этот остаток необходим не столько на стадии образования фермент-субстратного комплекса (модификация не приводит к потере способности фермента связывать нуклеотид), сколько на стадии его трансформации в продукты реакции. Скорее всего в катализе имидазольный цикл His¹⁰¹ должен функционировать в виде положительно заряженного иона (стабилизация отрицательно заряженного переходного состояния или протонирование «уходящей группы»), так как в комплексе каталитически неактивного модифицированного фермента с нуклеотидом гистидиновый остаток существует в незаряженной форме.

Экспериментальная часть

РНКазу *B. intermedius* 7P выделяли по методике, описанной ранее [2], из экспериментальных образцов отечественного производства. Химическая гомогенность препарата фермента была подтверждена результатом анализа N-концевых аминокислот, проведенного как описано в работе [2]: идентифицирован только N-концевой остаток аланина РНКазы *B. intermedius* 7P [4]. Гомогенный фермент имел следующие спектральные характеристики: $D_{280}/D_{260}=2,2$; $D_{280}/D_{250}=3,9$ (рН 5–7).

Гистидинмоногидрат, 3'-GMP, GrC (Sigma, США), диэтилпирокарбонат (Chemarol, СССР) использовали без дополнительной очистки. Poly(A) (Reanal, Венгрия) дополнительно очищали на сефадексе G-50 fine в 0,01 М бикарбонате аммония с последующей лиофилизацией.

Концентрацию нативного фермента, гистидина, 3'-GMP, GrC, poly(A) определяли спектрофотометрически, используя для РНКазы ϵ_{280} 22 500 [2], гистидина ϵ_{211} 5860 [17], 3'-GMP ϵ_{253} 13 700 [18], GrC ϵ_{280} 12 600 [19] и poly(A) ϵ_{260} 10 100 M⁻¹ см⁻¹ [20].

Концентрацию диэтилпирокарбоната определяли по образованию монокарбэтоксигистидина ($\Delta\epsilon_{242}$ 2900) при титровании 1 мл 0,01 М раствора гистидина в фосфатном буфере, рН 6–7, аликвотами разбавленного абсолютным этанолом исходного раствора реагента. Для разбавления и внесения диэтилпирокарбоната в реакционную смесь использовали микропипетки фирмы «Hamilton» (США).

Спектры поглощения, разностные спектры поглощения и кинетику ацилирования снимали с помощью спектрофотометра «Cary-118» (Varian, США) при 25° С и размере щели 0,8 мм, используя необходимые диапазоны чувствительности прибора.

Спектры флуоресценции снимали с помощью спектрофлуориметра «Jobin Yvon» (Франция) при размере щели 10 нм и возбуждении при

292 нм. Относительную интенсивность флуоресценции определяли, используя калибровочную прямую, построенную по флуоресценции нативной РНКазы.

Спектры $^1\text{H-NMR}$ были записаны на приборе XL-100-15 (Varian, США) в режиме Фурье-преобразования. Все химические сдвиги приведены относительно 2,2-диметил-2-силапента-5-сульфоната натрия, использованного в качестве внутреннего стандарта.

Модификацию диэтилпирокарбонатом проводили при 25°C в кювете с длиной оптического пути 1 см, содержащей 40 мкМ раствор РНКазы в 0,1 М натрий-ацетатном буфере, pH 6,0. Кювета сравнения содержала равный объем раствора РНКазы той же концентрации. Записывали нулевую линию от 300 до 235 нм, затем микропипеткой при быстром перемешивании добавляли разведенный перед опытом раствор диэтилпирокарбоната в объеме, не превышающем 1% объема реакционной смеси, и регистрировали изменение поглощения при 242 нм. После выхода кинетической кривой на плато записывали возникающий разностный спектр поглощения. *При деацилировании* в опытную и контрольную кюветы добавляли равный объем 1 М раствора гидроксилamina в 0,1 М трис-HCl-буфере, pH 7,5, и после прекращения изменения поглощения при 242 нм записывали разностный спектр.

Для получения монокарбэтоксипроизводных РНКазы в препаративном эксперименте к 20 мл 0,22 мМ раствора РНКазы в 0,1 М натрий-ацетатном буфере, pH 6,0, добавляли 25 мкл раствора диэтилпирокарбоната до конечной концентрации 0,74 мМ. После инкубации при 25°C в течение 20 мин реакционную смесь, обладающую 30% остаточной активности, наносили на колонку с фосфоцеллюлозой P-11 (Whatman, Англия), уравновешенной 0,1 М натрий-ацетатным буфером, pH 6,0, и хроматографировали в линейном градиенте концентрации NaCl (см. рис. 2). Два пика монокарбэтоксипроизводных РНКазы элюировали при 0,15 и 0,18 М, аликвоты фракций с максимальным поглощением использовали для обработки гидроксилaminом и для определения константы связывания с 3'-GMP.

Определение кинетических параметров ацилирования РНКазы проводили по кинетической кривой, полученной как описано выше. При одной и той же концентрации фермента (40 мкМ) варьировали концентрацию диэтилпирокарбоната от 35 до 635 мкМ. Начальная фаза реакции, во время которой происходило 50–70% от общего изменения, подчинялась кинетике псевдопервого порядка и из наклона прямых были получены значения констант скорости псевдопервого порядка по уравнению $k^I = (2,303/t) \lg ([E]_0 / [E_0 - P_t])$, где $[P]_t$ — количество образованного карбэтоксипроизводного РНКазы ко времени t ($\Delta\epsilon_{242}$ 2900). Связь между константой скорости псевдопервого порядка и эффективной константой скорости второго порядка $k_{\text{эфф}}^{II}$ определяется соотношением: $k^I = k_{\text{эфф}}^{II} [M]^n$, где $[M]$ — концентрация диэтилпирокарбоната, n — порядок реакции по модифицирующему агенту. Зависимость k^I от $[M]$ сохраняла линейность на всем используемом диапазоне концентраций модификатора и из наклона прямой определялось значение константы скорости для бимолекулярной реакции. Порядок реакции относительно диэтилпирокарбоната, определенный из наклона прямой зависимости $\lg k^I$ от $\lg [M]$, равен 1. При изучении pH-зависимости $k_{\text{эфф}}^{II}$ ацилирование проводили в 0,1 М натрий-ацетатном буфере. Значение pH раствора РНКазы измеряли до и после взаимодействия с диэтилпирокарбонатом с помощью pH-метра РН-240 (СССР) и комбинированного электрода (Radiometer, Дания) диаметром 5 мм с точностью $\pm 0,05$ ед. pH.

Определение активности нативной и модифицированной РНКазы проводили при 25°C аналогично описанному ранее, используя в качестве субстратов poly(A) при pH 8,0 [2] и GrC при pH 6,0 [3]. Активность выражали как изменение поглощения соответственно при 283 и 260 нм, отнесенное к концентрации фермента в кювете. Характер изменения активности модифицированного фермента на обоих субстратах был одинаков.

Для определения константы связывания модифицированного фермента с 3'-GMP разностные спектры поглощения, возникающие в присутствии 3'-GMP, получали, используя тандемные кюветы (Hellma, США) с длиной

оптического пути для каждого отделения 0,438 см и объемом 1 мл. В качестве растворителя применяли 0,1 М натрий-ацетатный буфер, рН 6,0, содержащий 0,1 М NaCl. Концентрация белка в термостатированных при 25° С кюветах после смешивания с лигандом составляла 13,6 и 16 мкМ для модифицированных белков пиков 1 и 2 рис. 2 соответственно, а нуклеотида — от 6 до 78,8 мкМ.

При расчете разностных молярных спектров комплексов концентрацию комплекса определяли, используя разностные коэффициенты молярного поглощения $\Delta\epsilon_{245}$ 4100, 4400 и 4300 $M^{-1} cm^{-1}$ для карбэтоксилированной РНКазы из пиков 1 и 2 рис. 2 и нативного фермента соответственно.

Авторы выражают благодарность Г. И. Клейнеру (Рига) за предоставление ферментного препарата РНКазы *B. intermedius* 7P.

ЛИТЕРАТУРА

1. Булгакова Р. М., Лещинская И. Б., Балабан Н. П., Егорова Г. С. Биохимия, 1974, т. 39, вып. 2, с. 299–302.
2. Голубенко И. А., Балабан Н. П., Лещинская И. Б., Волкова Т. И., Клейнер Г. И., Чепурнова Н. К., Афанасенко Г. А., Дудкин С. М. Биохимия, 1979, т. 44, вып. 4, с. 640–648.
3. Карпейский М. Я., Ханданян А. Ж., Чепурнова Н. К., Платонов А. Л., Яковлев Г. И. Биоорг. химия, 1981, т. 7, № 11, с. 1669–1679.
4. Афанасенко Г. А., Дудкин С. М., Каминир Л. Б., Голубенко И. А., Северин Е. С. Биоорг. химия, 1979, т. 5, № 2, с. 187–202.
5. Miles E. W. In: Methods in Enzymology. N. Y.: Acad. Press, 1977, v. 47, p. 431–442.
6. Loosemore M. J., Pratt R. F. FEBS Lett., 1976, v. 72, № 1, p. 155–158.
7. Аваева С. М., Краснова В. И. Биоорг. химия, 1975, т. 1, № 11, с. 1600–1605.
8. Grace M. E., Loosemore M. J., Lemmel M. L., Pratt R. F. J. Amer. Chem. Soc., 1980, v. 102, № 22, p. 6784–6789.
9. Prieels J. P., Bell J. E., Schindler M., Castellino F. J., Hill R. L. Biochemistry, 1979, v. 18, № 9, p. 1771–1776.
10. Melchior B., Fahrney D. Biochemistry, 1970, v. 9, № 2, p. 251–258.
11. Ehrenberg L., Fedorcsac I., Solymosy F. In: Prog. Nucl. Acid Res. Mol. Biol./Ed. Cohn W. E. New York — San Francisco — London: Acad. Press, 1976, v. 16, p. 189–262.
12. Holbrook J. J., Ingram V. A. Biochem. J., 1973, v. 131, № 4, p. 729–738.
13. Wu C.-W., Hammes G. G. Biochemistry, 1973, v. 12, № 7, p. 1400–1408.
14. Leonard N. J. J. Amer. Chem. Soc., 1973, v. 95, № 8, p. 2677–2682.
15. Hummel J. P., Witzel H. J. Biol. Chem., 1966, v. 241, № 5, p. 1023–1030.
16. Карпейский М. Я. Молекуляр. биология, 1976, т. 10, № 6, с. 1197–1210.
17. Handbook of biochemistry and molecular biology, 1968. B-73, 2nd Edition. CRC Press. Ed. Sober H. A.
18. Handbook of biochemistry and molecular biology. v. 1, Nucleic Acids, 1975, 3rd Edition, CRC Press.
19. Zabinksi M., Walz F. G. Biochemistry, 1978, v. 17, № 20, p. 4124–4130.
20. Holcomb D. N., Tinoco I. Biopolymers, 1965, v. 3, № 1, p. 121–133.

Поступила в редакцию
10.II.1982

A STUDY ON FUNCTIONAL ROLE OF HISTIDINE-101 IN RIBONUCLEASE *BACILLUS INTERMEDIUS* 7P

GOLUBENKO I. A., LESHCHINSKAYA I. B., KARPEISKY M. Ya.,
YAKOVLEV G. I.

V. I. Ulyanov-Lenin State University, Kazan; Institute of Molecular
Biology, Academy of Sciences of the USSR, Moscow

Ribonuclease *Bacillus intermedius* 7P was inactivated by diethylpyrocarbonate in a sodium acetate buffer at pH 6,0 and 25° C. The restoration of enzymatic activity on treatment with hydroxylamine and data of the spectrophotometric and fluorometric analyses all suggest that inactivation is due solely to ethoxyformylation of a single histidine residue. The pH-dependence of modification was studied, and pH-independent rate constant of 20 $M^{-1}c^{-1}$ was found. Two monoethoxyformylated species of the enzyme having identical physico-chemical properties were isolated. The data suggest that a single histidine residue of RNase should be located in the phosphate binding region of the enzyme active site. Modification of the nonprotonated histidine residue was shown to occur in the enzyme complex with Guo-3'P characterized by the pH-independent rate constant equal to that of free enzyme.