



УДК 577.152.277/136

ТОПОХИМИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ПИРИМИДИНОВОЙ  
СПЕЦИФИЧНОСТИ РИБОНУКЛЕАЗЫ А*Карнейский М. Я., Моисеев Г. П., Боцаров А. Л.,  
Богданова Г. А., Михайлов С. Н., Яковлев Г. И.**Институт молекулярной биологии Академии наук СССР, Москва*

С целью исследования природы и функциональной роли взаимодействия между гетероциклическими основаниями субстрата и аминокислотными остатками активного центра РНКазы А синтезированы аналоги пириимидиновых 2',3'-циклофосфатов, в которых селективно удалены или изостерически замещены гетероатомами пириимидинового кольца. С помощью pH-стата измерены кинетические параметры их ферментативного гидролиза. Для соединений, не гидролизующихся РНКазой А, методом <sup>13</sup>C-ЯМР изучена структура комплексов соответствующих 3'-фосфатов с ферментом.

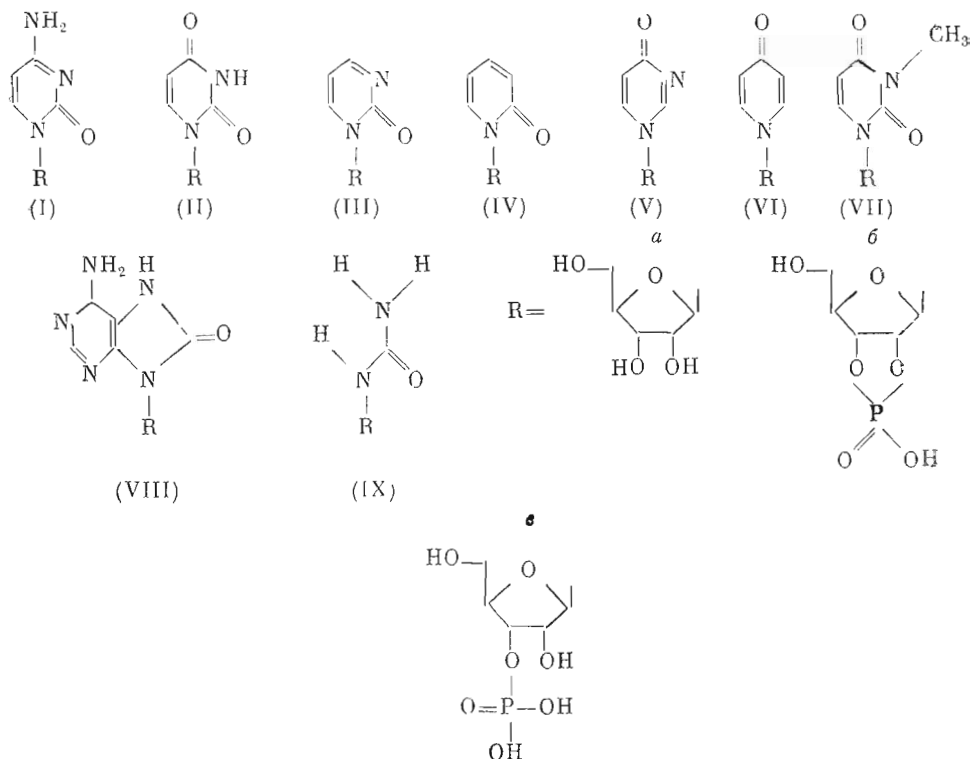
Данные кинетики и ЯМР позволяют считать, что субстрат в продуктивном фермент-субстратном комплексе находится в *анти*-конформации, как это было предположено на основании рентгеноструктурных исследований комплексов фермента с пириимидиновыми нуклеотидами. Оценены константы скоростей для лактамной (медленная) и лактимной (быстрая) форм пириимидиновых субстратов.

В течение многих лет панкреатическая рибонуклеаза является классическим объектом молекулярной энзимологии. К настоящему времени накоплена обширная и детальная информация о структуре фермента в кристалле и растворе, о свойствах активного центра, о молекулярных механизмах специфичности и каталитической активности [1-5]. Вместе с тем интенсивные исследования последних лет структуры фермент-нуклеотидных комплексов с использованием набора аналогов субстратов и продуктов привели к тому, что наметившиеся на основе первоначальных структурных исследований РНКазы представления о молекулярном механизме «узнавания» субстрата стали терять свою однозначность и убедительность [6-11]. Ключевым моментом для понимания «пириимидиновой» специфичности РНКазы является однозначное определение конформации нуклеотида в «пириимидин»-связывающем участке активного центра и, как следствие этого, выявление специфических контактов между белком и пириимидиновым основанием молекулы субстрата. Согласно представлениям, сложившимся в настоящее время на основе данных рентгеноструктурного анализа РНКазы S(A) и фермент-нуклеотидных комплексов, пириимидиновый фрагмент субстрата (лиганда) связывается в *анти*-конформации в участке активного центра, который стерически и электронно комплементарен той части молекулы лиганда, в которой расположены гетероатомами основания (рис. 1а).

Опираясь на литературные и собственные экспериментальные данные, мы сформулировали гипотезу о критической роли взаимодействий между остатком Thr<sup>45</sup> и «амидным» фрагментом основания субстрата для специфического «узнавания» РНКазой пириимидиновых субстратов, которое может реализоваться только при условии, что пириимидиновый фрагмент субстрата в фермент-субстратном комплексе находится в *анти*-конформации [9]. Именно это положение было подвергнуто сомнению в работах, посвященных изучению методом ЯМР комплексов РНКазы с пириимидиновыми нуклеотидами [6, 8]. В настоящей работе методами ферментативной кинетики и ЯМР изучено взаимодействие РНКазы А с аналогами субстратов и продуктов реакции в водном растворе. Цель ис-

Нестандартные сокращения: 2OxPug — 1,2-дигидропириимидин-2-он, 4OxPug — 1,4-дигидропириимидин-4-он, 2OxPy — 1,2-дигидропиримидин-2-он, 4OxPy — 1,4-дигидропиримидин-4-он, 3MeUrd — 3-метилуридин, 8OxAdo — 8-оксааденозин.

следования состояла в получении достоверных интерпретируемых данных о конформации субстрата в продуктивном фермент-субстратном комплексе и в установлении природы и функциональной роли взаимодействий между ферментом и гетероатомами пиримидинового основания субстрата в таком комплексе. Очевидно, что для получения желаемой информации наряду с природными нуклеотидами необходимо иметь аналоги, в которых селективно удалены или изостерически замещены гетероатомы пиримидинового кольца. В качестве таких аналогов были выбраны соединения (Iб)–(IXб). Некоторые из приведенных нуклеозид-2',3'-циклофосфатов ((I)–(V)) в литературе уже описаны. Однако до настоящего времени не было разработано удобного и общего метода синтеза нуклеозидциклофосфатов, исходя из незащищенных нуклеозидов.



Имеющиеся в литературе методы селективного фосфорилирования *cis*-диольной группы включают в себя щелочную обработку [12–14], что не позволяет использовать их для фосфорилирования щелочнолабильных пиримидиновых нуклеозидов (III, V, VII) [15, 16]. Так, соединение (IIIб) было ранее синтезировано с выходом 10% фосфорилированием соответствующего рибозилпиримидин-2-она (IIIа) ортофосфорной кислотой в присутствии трихлорацетонитрила [17]. Низкий выход объясняется неселективным протеканием реакции фосфорилирования. Циклофосфат (IVб) был получен в несколько стадий. Тритиллирование рибозилпиримидин-2-она (IVа) с последующим фосфорилированием β-цианэтилфосфатом в присутствии N,N'-дихлоргексикарбодимидом (DCC) с последующим удалением защитных групп и циклизацией приводило к соединению (IVб) с суммарным выходом 25% [18]. Фосфорилирование рибозида (IVа) триэтилфосфитом с последующим окислением давало циклофосфат (IVб) с выходом 50% [18]. Циклофосфат (Vб) был синтезирован ранее восстановлением 2-тиоуридин-2'-(3')-фосфата над никелем Рэя с последующей циклизацией [19].

В 1974 г. Моффатом с сотр. [14] был предложен удобный метод селективного фосфорилирования *cis*-диольной группы обработкой 2'-(3')-О-стабилизированных производных нуклеозидов хлорокисью фосфора в присутствии акцептора кислоты в метаноле. В этой же работе ука-

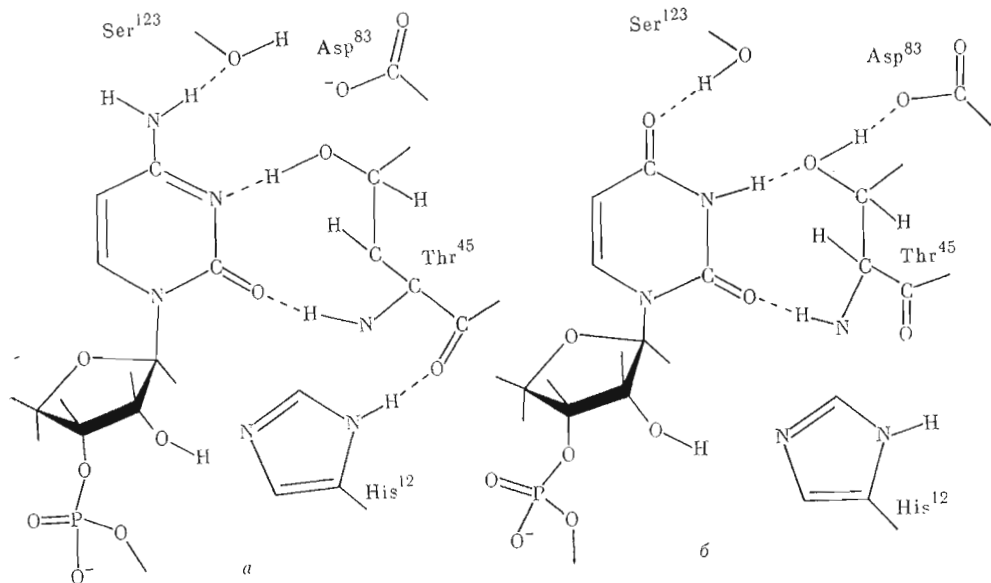


Рис. 1. Структура водородных связей аминокормы цитидина (а) и лактамной формы уридина (б) в фермент-субстратных комплексах РПКазы А

зано на принципиальную возможность использования в качестве фосфорилирующего агента дифенилхлорфосфата [14]. Однако было отмечено, что с помощью этого реагента не удавалось получать нуклеозид-2'(3')-фосфаты в чистом виде.

На основе этого метода нами был разработан удобный способ получения нуклеозид-2',3'-циклофосфатов из соответствующих незащищенных нуклеозидов. Фосфорилирование 2'(3')-О-дибутилстаннилиденовых производных нуклеозидов, полученных *in situ* из пиридиноновых и пиридиноновых нуклеозидов и окиси дибутилолова в метаноле, дифенилхлорфосфатом приводит к неустойчивым дифениловым эфирам нуклеозид-2'(3')-фосфатов, гидролиз которых водой дает фениловые эфиры нуклеозид-2'(3')-фосфатов. Фенильные группы могут быть легко удалены как в кислой, так и в щелочной среде в мягких условиях [20]. В связи с известной неустойчивостью пиридиноновых нуклеозидов (III), (V), (VII) в щелочной среде [15, 16] щелочное удаление фенильных групп было осуществлено только в случае пиридиноновых нуклеотидов (IV), (VI), а устойчивость пиридиноновых нуклеозидов в кислой среде позволила провести удаление фенильных защитных групп кислотным гидролизом (рН 1; 1 ч при 50°С) и получить соответствующие 2'(3')-нуклеотиды, циклизация которых в присутствии DCC [21] приводила к нуклеозид-2',3'-циклофосфатам (IIIб)–(VIIб) с общими выходами после хроматографии на DEAE-целлюлозе 50–70% в расчете на исходные нуклеозиды (IIIа)–(VIIа).

Возможность удаления фенильных защитных групп как в кислой, так и в щелочной среде, а также возможность ферментативного гидролиза смеси фениловых эфиров 2'(3')-нуклеотидов до 3'-нуклеотида и фенилового эфира 2'-нуклеотида, легко разделяемых ионообменной хроматографией, позволяет считать предлагаемый метод универсальным и применимым для синтеза нуклеозид-2',3'-циклофосфатов и 3'-нуклеотидов из любых нуклеозидов.

Структура полученных таким образом соединений была подтверждена сравнением их УФ-спектров с УФ-спектрами соответствующих N- и O-метильных производных пиридонов и пиридинонов [22, 23], а также спектрами <sup>1</sup>H- и <sup>31</sup>P-ЯМР. 2',3'-Циклофосфат 8-оксоаденозина (VIIIб) был получен циклизацией соответствующего 2'(3')-фосфата (VIIIв) [24]. Фосфорибозилмочевину (IXв) синтезировали обработкой уридин-2'(3')

Кинетические параметры гидролиза РНКазой А  
пиримидин-2',3'-циклофосфатов и их аналогов\*

Субстрат	$k_{\text{кат}}, \text{с}^{-1}$	$K_m \cdot 10^3, \text{M}$	$\frac{k_{\text{кат}}}{K_m}, \text{M}^{-1}\text{с}^{-1}$
Cyd-2',3'-P (Iб)	5,7	0,8	7120
	5,5 **	3,3 **	
	7,3 ***	3,5 ***	
Urd-2',3'-P (IIб)	4,0	3,0	1330
	1,4 **	3,6 **	
	3,2 ***	6,9 ***	
2OxPyr-Rib-2',3'-P (IIIб)	5,2	10	520
2OxPy-Rib-2',3'-P (IVб)	2,0	100	20
	0,2 ***	1,5 ***	
8OxAdo-2',3'-P (VIIIб)	0,005	1,65	3,3
NH <sub>2</sub> CONH-Rib-2',3'-P (IXб)	0,024	125	0,2
3MeUrd-2',3'-P (VIIб)			
4OxPyr-Rib-2',3'-P (Vб)			
4OxPy-Rib-2',3'-P (VIб)			

Не субстраты

\* Условия см. в «Экспер. части».

\*\* Данные работы [2]: спектрофотометрические измерения, диметилглутаровый буфер.

\*\*\* Данные работы [26]: измерение методом рЕ-статирования, рН 7; 0,2 M NaCl.

фосфата перекисью водорода при рН 9,5 [25]. При этом наряду с расщеплением пиримидинового цикла происходит аномеризация. Дальнейшая циклизация в присутствии ДСС приводит к 2',3'-циклофосфату N-( $\alpha,\beta$ -D-рибофуранозил)мочевины, соотношение аномеров  $\alpha$  и  $\beta$ , по данным ПМР-спектров, составляло 3:2.

Анализ кинетических параметров реакции гидролиза РНКазой А нуклеозид-2',3'-циклофосфатов, использованных в данной работе (таблица), позволяет однозначно решить вопрос о конформации субстрата в продуктивном фермент-субстратном комплексе. Ранее, измеряя ядерный эффект Оверхаузера между протонами 6-Н и 1'-Н, величина которого существенно зависит от торсионного гликозидного угла ( $\varphi_{\text{CN}}$ ), мы показали, что цитидин-3'-фосфат в комплексе с РНКазой в растворе при рН 5,0–6,7 находится в *анти*-конформации ( $\varphi_{\text{CN}} \sim 330^\circ$ ) [27, 28].

Эти результаты, хотя и свидетельствуют о том, что основание субстрата также находится в *анти*-конформации в комплексе с ферментом, тем не менее не позволяют исключить *анти* – *син*-изомеризацию субстрата в активном центре фермента, которая постулировалась в работе [6]. В связи с этим мы исследовали взаимодействие 4-пиримидинового (Vб) и 4-пиримидинового (VIб) аналогов уридин-2',3'-циклофосфата с РНКазой А. Оказалось, что оба циклофосфата, для которых характерно отсутствие 2-оксогруппы, не гидролизуются РНКазой А даже при значительном избытке фермента. Столь же устойчивым к гидролизу РНКазой А оказался и циклофосфат (VIIб), что хорошо согласуется с развешиваемыми нами положениями. *анти*-Конформер этого соединения не может специфически связаться в активном центре РНКазы, так как атом водорода «амидного» фрагмента основания замещен на метильную группу, которая препятствует образованию «критических» водородных связей между основанием и остатком Thr<sup>13</sup>. Таким образом, только *син*-конформер мог бы занять пиримидинспецифический участок активного центра фермента, так как в этом случае метильная группа оказывается на месте протона Н-5 субстрата и отсутствуют стерические препятствия для ее расположения в пространстве [3]. Полученные результаты однозначно указывают на то, что *син*-форма субстрата если и связывается с активным центром фермента, то не подвергается гидролизу.

Следовательно, можно считать установленным, что субстрат в продуктивном фермент-субстратном комплексе находится в *анти*-конформации, как это и предполагалось в первых работах по рентгеноструктурному анализу комплексов РНКазы S с пиримидиновыми нуклеотидами [4].

Таким образом, рассмотрение функциональной роли водородных связей, которые могут образовываться между остатками Thr<sup>45</sup>, Ser<sup>123</sup> и гетероатомами пиримидинового основания субстрата, является вполне правомерным и оправданным, так как эти связи контролируют возможность образования специфического фермент-субстратного комплекса. Резкое уменьшение сродства к ферменту обсуждаемых аналогов субстрата и их устойчивость к гидролизу РНКазой подтверждают высказанное нами ранее предположение, что «критическим» для узнавания субстрата ферментом является взаимодействие «амидного» фрагмента основания субстрата с гетероатомами остатка Thr<sup>45</sup> [9]. Действительно, во всех трех соединениях (Vб), (VIб), (VIIб) имеется карбонильный атом кислорода в четвертом положении основания, занимающий при любой конформации нуклеотида в комплексе то же самое место, что и соответствующий атом уридин-2',3'-циклофосфата, для которого постулировалась водородная связь с гидроксильной группой остатка Ser<sup>123</sup>.

Анализ кинетических параметров гидролиза 2-пиримидинового циклофосфата (IIIб) (4-дезаминцитидинциклофосфата) показывает, что константа скорости гидролиза этого соединения РНКазой А близка к соответствующему значению для цитидин-2',3'-циклофосфата (Iб) (см. таблицу). Отсутствие экзоциклической группы в четвертом положении основания, способной образовывать водородную связь с оксигруппой остатка Ser<sup>123</sup>, приводит лишь к возрастанию величины  $K_m$ , т. е. к уменьшению константы связывания примерно на порядок по сравнению с цитидин-2',3'-циклофосфатом.

Подтверждение заключения о функциональной важности образования водородных связей между амидным фрагментом основания пиримидиновых нуклеотидов и остатком Thr<sup>45</sup> было получено нами при анализе взаимодействия 4-пиримидинового (Vв), 4-пиридинового (VIв) и 3-метильного (VIIв) аналогов с РНКазой А методом <sup>1</sup>H-ЯМР.

Известно, что при образовании комплексов пиримидиновых нуклеотидов с РНКазой А происходит изменение химических сдвигов протонов основания 5-Н и 6-Н и протона рибозы 1'-Н. Кроме того, изменяются химические сдвиги протонов боковых групп некоторых аминокислотных остатков — His<sup>12</sup>, His<sup>119</sup> и Tyr<sup>25</sup> [29]. Сравнение химических сдвигов протонов основания и 1'-Н рибозы 3'-фосфатов (Vв) — (VIIв) в растворе без РНКазы А и в ее присутствии показало, что они не изменяются вплоть до отношений белок — нуклеотид 1:1 и концентрации белка  $5 \cdot 10^{-3}$  М. Не наблюдалось также изменений химических сдвигов протонов остатка Tyr<sup>25</sup> вплоть до отношений белок — нуклеотид 1:20 и концентрации белка  $1 \cdot 10^{-3}$  М. При этом изменение химических сдвигов С-2-протонов остатков His<sup>12</sup> и His<sup>119</sup> практически не зависело от природы нуклеотида и соответствовало константе диссоциации комплекса белок — нуклеотид  $\sim 4 \cdot 10^{-3}$  М (рис. 2). Это значение близко к величине константы диссоциации комплекса РНКазы А — неорганический фосфат [30]. Этот результат вместе с неизменностью при комплексообразовании химических сдвигов протонов нуклеотида и протонов ароматического ядра остатка Tyr<sup>25</sup> (изменение химических сдвигов которого при образовании комплексов является показателем связывания нуклеозида в пиримидинсвязывающем участке активного центра РНКазы А [9]) позволяет считать, что комплексообразование в этом случае, по-видимому, осуществляется только за счет неспецифического взаимодействия отрицательно заряженной фосфатной группы нуклеотида и положительных зарядов белка.

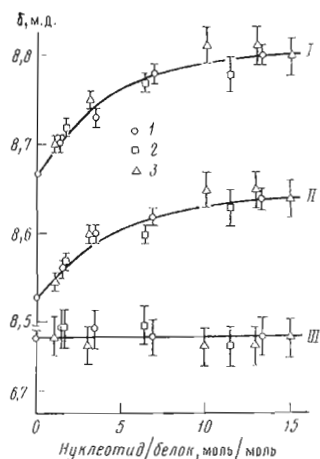


Рис. 2. Зависимость химических сдвигов С2-протонов остатков His<sup>119</sup> (I), His<sup>12</sup> (II) и Tyr<sup>25</sup> (III) РНКазы А (1,44 мМ) от отношения нуклеотид — белок (рН 3,5) для 8MeUrd-3'-P (I), 4OxPy-Rib-3'-P (2) и 4OxPyR-Rib-3'-P (3)

Таким образом, полученные нами данные однозначно указывают на то, что постулированная ранее водородная связь между ОН-группой остатка Ser<sup>123</sup> и amino-(оксо-)группой пиримидинового основания субстрата если и образуется в фермент-субстратном комплексе, то практически не влияет ни на характер связывания субстрата, ни на скорость его превращения.

Проведенные нами исследования гидролиза циклофосфатов пиримидиновых и пиридиновых нуклеотидов РНКазой дают возможность оценить роль водородных связей, образуемых «амидным» фрагментом основания субстрата и остатка Thr<sup>45</sup> фермента, в образовании фермент-субстратных комплексов. Из данных таблицы видно, что субстратами РНКазы служат только те аналоги, в которых имеется оксогруппа во втором положении гетероциклического основания, способная образовать водородную связь с NH-группой остатка Thr<sup>45</sup>.

Более сложным является вопрос о функциональной роли водородной связи, образуемой ОН-группой остатка Thr<sup>45</sup> с N-3-атомом гетероциклического основания субстрата. На основании изучения структуры комплексов РНКазы А с производными цитидина и уридина в растворе методами ЯМР мы пришли к выводу, что в случае производных уридина имеется равновесие между двумя типами комплексов. Различие между ними состоит в том, что в одном из них основание находится в лактимной форме (цитидиноподобной), в другом — в лактамной. По-видимому, в продуктивных фермент-субстратных комплексах основание уридинсодержащих субстратов находится в лактимной форме и, следовательно, способно образовывать такого же типа водородные связи с белком, как и цитидин. Предполагалось, что только примерно треть образуемых фермент-субстратных комплексов производных уридина продуктивна. Остальные две трети общего числа комплексов, в которых основание уридина представлено лактамной формой, превращаются в продукты с существенно меньшей эффективностью [11].

В качестве моделей лактамной («медленной») формы уридинциклофосфата мы использовали 2',3'-циклофосфаты 8-оксоаденозина (VIIIб) и рибозилмочевины (IXб). Методами рентгеноструктурного анализа и ЯМР было показано, что 3'-фосфат (VIIIв) связывается в пиримидинсвязывающем участке активного центра РНКазы А. При этом его «амидный» фрагмент N7-H и C8=O подобно соответствующему фрагменту цитозинового и урацильного основания способен образовывать водородные связи с остатком Thr<sup>45</sup> [9, 24]. Согласно нашим данным, циклофосфат (VIIIб) является субстратом РНКазы А, хотя эффективность его гидролиза примерно в 2200 раз хуже, чем для цитидинциклофосфата. При этом величина  $K_m$  только в 2 раза больше, чем для цитидинциклофосфата, в то время как  $k_{кат}$  ниже примерно в  $10^3$  раз (таблица).

Однако сравнительно низкое значение  $k_{кат}$  для циклофосфата (VIIIб) может быть обусловлено различным положением фосфата в комплексах циклофосфатов цитидина и 8-оксоаденозина с ферментом по отношению к каталитическим группам последнего за счет различия в углах между направлением гликозидной связи и «амидным» фрагментом пиримидинового и пиридинового колец цитозина и 8-оксоаденозина. Поэтому в качестве второй модели лактамной формы уридин-2',3'-циклофосфата мы использовали 2',3'-циклофосфат рибозилированной мочевины. Можно было ожидать, что замена пиримидинового кольца субстрата мочевиной существенно увеличит значение  $K_m$ , однако величина  $k_{кат}$  такого субстрата будет характеризовать скорость гидролиза лактамной формы уридинциклофосфата. Было обнаружено, что величина  $k_{кат}$  для циклофосфата (IXб) только в 5 раз превышает соответствующее значение для циклофосфата (VIIIб). Отношение величин  $K_m$  составляло ~80.

В соответствии с этими результатами можно считать, что скорость гидролиза лактамной формы уридинциклофосфата примерно в 240 раз ниже по сравнению с 2',3'-циклофосфатом цитидина, в то время как константы диссоциации их комплексов с ферментом близки между собой.

Таким образом, форма субстрата РНКазы А, имеющая гетероатом в третьем положении пиримидинового основания, способный образовывать

водородную связь, выступая в качестве донора протона, гидролизуеться с существенно меньшей константой скорости, чем форма, указанный гетероатом основания которой проявляет протоноакцепторные свойства.

Для установления влияния, оказываемого характером водородных связей, образуемых пиримидиновыми основаниями субстратов с молекулой фермента, на его каталитическую активность, представлялось целесообразным исследовать субстраты, у которых водородная связь между третьим положением гетероциклического основания и ферментом отсутствует.

Наиболее подходящим в указанном отношении, на наш взгляд, является 2-пиридиновый аналог (IVб). Хотя возможность образования водородной связи между атомом углерода, находящимся в третьем положении основания и способного выступать в качестве донора протона, и кислородом оксигруппы остатка Thr<sup>45</sup> исключить нельзя, можно ожидать существенного уменьшения ее энергии по сравнению с тем, когда подобная связь образуется NH-группой урацильного основания. Вопреки данным работы [2] мы наблюдали для циклофосфата (IVб) значительное возрастание величины  $K_m$  по сравнению с цитидин-2',3'-циклофосфатом. Вместе с отмеченным ранее увеличением  $K_m$  примерно на порядок величины при элиминировании одной водородной связи основания с белком для 2-пиримидинового аналога (IIIб) возрастание примерно на ту же величину  $K_m$  при переходе к 2-пиридиновому аналогу (IVб) позволяет полагать, что действительно водородная связь между С3-атомом 2-пиридона и белком или отсутствует, или является очень слабой. Значение  $k_{кат}$  для этого субстрата было найдено равным  $2 \text{ с}^{-1}$ , т. е. составляет примерно  $1/3$  соответствующей величины для цитидин-2',3'-циклофосфата. Наблюдаемое относительно небольшое возрастание значения  $K_m$  (приблизительно в 10 раз) при элиминировании одной водородной связи, соответствующее уменьшению свободной энергии на  $\sim 1,4$  ккал/моль, является, скорее всего, следствием того, что образованию водородных связей между основанием субстрата и группами белка предшествует дегидратация основания и этих групп.

Для комплекса циклофосфата (IVб) с РНКазой А характерно, по-видимому, отсутствие водородной связи между основанием и OH-группой остатка Thr<sup>45</sup>, так как образуемые этой группой водородные связи с остатком Asp<sup>83</sup> или молекулами растворителя оказываются энергетически более выгодными. Поэтому, как и в случае свободного фермента, аминокислотный остаток Thr<sup>45</sup> наиболее вероятно находится в двух конформационных состояниях. Соотношение между этими двумя конформерами белка и определяет константу скорости гидролиза 2-пиридинового аналога (IVб), т. е. третья часть комплексов существует в форме, когда между остатками Thr<sup>45</sup> и His<sup>12</sup> имеется водородная связь, и две трети — в форме, когда эта связь не образуется.

Таким образом, образование водородной связи между OH-группой остатка Thr<sup>45</sup> и атомом азота (акцептор) в третьем положении основания уридиновых субстратов приводит к стабилизации лактимной формы урацильного кольца и образованию такой системы водородных связей в активном центре фермента, которая фиксирует реагирующие атомы в наиболее реакционноспособной форме и конфигурации.

Структуру комплекса уридинсодержащего субстрата с учетом результатов данного исследования можно представить в следующем виде (рис. 1б). Комплексы субстрата с урацильным основанием в лактимной форме характеризуются структурой, подобной структуре комплексов цитидина. Для лактамной формы, по-видимому, характерно образование водородной связи между NH-группой основания и атомом кислорода OH-группы остатка Thr<sup>45</sup>, которая одновременно связана водородной связью с остатком Asp<sup>83</sup>, (рис. 1б), при этом водородная связь между карбонильной группой остатка Thr<sup>45</sup> и N-1-атомом остатка His<sup>12</sup> отсутствует. Относительно медленная скорость превращения фермент-субстратного комплекса при отсутствии водородной связи между остатками His<sup>12</sup> и Thr<sup>45</sup>, по-видимому, обусловлена, с одной стороны, более низким значением  $pK$  в этом случае [11], а с другой — большей подвижностью импдазольного кольца остатка His<sup>12</sup> по сравнению с тем, когда эта связь реализуется.



Следует отметить, что лактамная форма уридина является преобладающей в нейтральных водных растворах и соотношение лактамной и лактимной форм составляет  $10^{3,3}-10^{4,0}$  [31]. Поэтому для изомеризации уридина до соотношений указанных форм  $\sim 3:1$  требуется 4–5 ккал/моль. В работе [32] было экспериментально показано, что разница энергий десольватации 1-Ме-цитозина и 1-Ме-уридина при переходе от воды к хлороформу составляет  $\sim 2,5$  ккал/моль. Можно полагать, что эта разница энергий десольватации будет еще выше при переходе от воды к белку, поскольку диэлектрическая постоянная среды на поверхности белка, по-видимому, меньше, чем в случае хлороформа [33]. Поэтому близость по величине экспериментальных значений константы связывания цитидин- и уридинсодержащих лигандов РНКазы А, вероятно, определяется приблизительным равенством разницы энергии их десольватации и энергии изомеризации уридинсодержащих субстратов в активном центре фермента.

### Экспериментальная часть

В работе использовали препарат РНКазы А (КФ 3.1.27.5), приготовленный по методике работы [34], и препарат неспецифической РНКазы *Penicillium brevicompactum* (КФ 3.1.4.23), очищенный как описано в работе [35].

Скорость ферментативного гидролиза нуклеозид-2',3'-фосфатов измеряли как скорость появления кислоты, вызванной образованием 3'-фосфатов и вторичной ионизацией их фосфатных групп при pH 6,5, с помощью pH-стата (Radiometer). Автоматическое pH-статирование осуществлялось подачей в кювету 0,56 мМ раствора КОН автоматической бюреткой АВУ-12. Кюветы термостатировались при 25°С. Раствор в кювете перемешивали в течение всего эксперимента магнитной мешалкой. Объем реакционной смеси составлял 2,05–2,10 мл. Объем раствора КОН, добавляемый для pH-статирования, в течение эксперимента не превышал 0,2 мл. Для циклофосфатов (Iб), (IIб), (IIIб), (IVб), (VIIб) и (IXб) методом ЯМР установлено образование при гидролизе РНКазой А единственного продукта, который был идентифицирован в каждом случае как соответствующий 3'-фосфат. Для циклофосфатов (Vб)–(VIб) гидролиз не был зарегистрирован при концентрации нуклеотида  $5 \cdot 10^{-2}$  М и РНКазы  $10^{-3}$  М; более того, спектр <sup>1</sup>H-ЯМР не изменялся через 24 ч после добавления  $2 \cdot 10^{-3}$  М РНКазы А при соотношении белок – нуклеотид 1:5 и pH 6,5 (см. таблицу).

Для определения концентрации 2',3'-циклофосфатов использовались следующие значения молярных коэффициентов поглощения при pH 7,0 (приведем соответствующий нуклеозид,  $\epsilon$ , М<sup>-1</sup>·см<sup>-1</sup>; в скобках – длина волны, нм): Urd 9570 (258,5) [36]; Cyd 8400 (268) [30]; 2ОхPyr-Rib 6200 (302); 2ОхPy-Rib 5500 (300); 4ОхPyr-Rib 14 600 (243); 4ОхPy-Rib 17 300 (268); 8ОхAdo 9800 (270); 3MeUrd 10 000 (262). Концентрацию 2',3'-циклофосфата рибозилмочевины определяли по навеске.

Начальные скорости реакций определяли с использованием начальной части кинетической кривой, регистрируемой в течение 5–10 мин. С целью повышения точности определений кинетических параметров применяли метод расчета скорости реакции при нулевом времени, предложенный в работе [37]. Учет при расчетах неполной вторичной ионизации фосфатных групп продуктов при pH 6,5 проводили, принимая величину рК равной 5,9. Неточность принимаемых значений рК  $\sim 0,2$  приводила к ошибке рассчитанных значений  $k_{\text{нат}} \sim 7\%$ .

Спектры ЯМР соединений в D<sub>2</sub>O регистрировали на спектрометрах Varian XL-100 (США) с рабочей частотой по протонам 100 МГц и Nicolet MG-360 (США) с рабочей частотой 360 МГц. Химические сдвиги протонов нуклеотидов были измерены относительно *трет*-бутанола, а протонов комплексов РНКазы А с нуклеотидами – относительно 2,2-диметил-2-силанпентан-5-сульфоната как внутренних стандартов; все химические сдвиги в шкале  $\delta$  (м.д.) приводятся относительно последнего. Химические сдвиги фосфорных резонансов были измерены относительно 85% Н<sub>3</sub>РО<sub>4</sub> как внеш-



него стандарта. Константы спин-спиновых взаимодействий даны в герцах. Зависимости химических сдвигов протонов гистидиновых остатков рассчитаны по формуле  $\delta = \delta_0 + \Delta\delta \cdot n$ , где  $n$  — отношение концентрации белка в комплексе с нуклеотидом к общей концентрации белка;  $\Delta\delta$  равно 0,15 м.д. для остатка His<sup>19</sup> и 0,12 м.д. для His<sup>12</sup>. Константы диссоциации комплексов приняты равными  $4 \cdot 10^{-3}$  М (рис. 2).

УФ-спектры регистрировали на спектрофотометрах Specord UV-VIS (ГДР) и Beckman 26 (США). Хроматографию в тонком слое проводили на пластинках Silufol UV<sub>254</sub> (ЧССР) в системе изопропанол — аммиак — вода, 7:1:2. Положение нуклеозидов на хроматограммах определяли по УФ-флуоресценции, а рибозилированных производных мочевины — путем окрашивания их 1% раствором *n*-диметиламинобензальдегида в смеси метанол — HCl (конц.) в соотношении 95:5 (ярко-желтая окраска).

Нуклеозиды пиримидонов и пиридонов были получены гликозилированием триметилсилильных производных пиридонов и пиримидинов 1-О-ацетил-2,3,5-три-*O*-бензоил- $\beta$ -*D*-рибофуранозой в присутствии SnCl<sub>4</sub> по методу Нидбаллы и Форбрюггена [38] с последующим удалением бензоильных групп аммиаком в метаноле.

*I*-( $\beta$ -*D*-Рибофуранозил)-1,2-дигидропиридин-2-он (IVa). УФ-спектр:  $\lambda_{\text{макс}}^{\text{pH } 1-7}$  300 нм ( $\epsilon$  5500), 226 нм (5000). ПМР-спектр: 7,95 ддд (1H,  $J_{6,5}$  6,9,  $J_{6,4}$  1,9,  $J_{6,3}$  0,8; 6-H), 7,67 ддд (1H,  $J_{4,6}$  1,9,  $J_{4,5}$  6,8,  $J_{4,3}$  9,4; 4-H), 6,64 м (2H,  $J_{3,5}$  1,2; 3-H и 5-H), 6,10 д (1H,  $J_{1',2'}$  3,0; 1'-H), 4,40–4,20 м (3H, 2', 3', 4'-H), 3,98 м (2H, 5'a-, 5'b-H).

*I*-( $\beta$ -*D*-Рибофуранозил)-1,4-дигидропиридин-4-он (VIa). УФ-спектр:  $\lambda_{\text{макс}}^{\text{pH } 1}$  248 нм ( $\epsilon$  11 400),  $\lambda_{\text{макс}}^{\text{pH } 7}$  268 нм (17 300). ПМР-спектр: 8,12 м ( $A_2X_2$ ) (2H,  $J_{6,5}$  7,7; 2-H и 6-H), 6,66 м ( $A_2X_2$ ) (2H,  $J_{2,3}$  7,7; 3-H и 5-H), 5,65 д (1H,  $J_{1',2'}$  5,0; 1'-H), 4,43–4,20 м (3H, 2', 3', 4'-H), 3,95 м (2H, 5'a-, 5'b-H).

*I*-( $\beta$ -*D*-Рибофуранозил)-1,2-дигидропиримидин-2-он (IIIa). УФ-спектр:  $\lambda_{\text{макс}}^{\text{pH } 1}$  314 нм ( $\epsilon$  7500),  $\lambda_{\text{макс}}^{\text{pH } 7}$  302 нм (6200). ПМР-спектр: 8,7 дд (1H,  $J_{6,5}$  4,4,  $J_{6,4}$  2,6; 6-H), 8,58 дд (1H,  $J_{4,5}$  6,7,  $J_{4,6}$  2,6; 4-H), 6,81 дд (1H,  $J_{5,4}$  6,7,  $J_{5,6}$  4,4; 5-H), 5,97 д (1H,  $J_{1',2'}$  2,3; 1-H), 4,44–4,30 м (3H, 2', 3', 4'-H), 4,00 м (2H, 5'a-, 5'b-H).

*I*-( $\beta$ -*D*-Рибофуранозил)-1,4-дигидропиримидин-4-он (Va). УФ-спектр:  $\lambda_{\text{макс}}^{\text{pH } 1}$  234 нм ( $\epsilon$  10 700),  $\lambda_{\text{макс}}^{\text{pH } 7}$  243 нм (14 600). ПМР-спектр: 8,58 д (1H,  $J_{2,6}$  2,6; 2-H), 8,03 дд (1H,  $J_{6,5}$  7,8,  $J_{6,2}$  2,6; 6-H), 6,45 д (1H,  $J_{5,6}$  7,8; 5-H), 5,62 д (1H,  $J_{1',2'}$  5,2; 1'-H), 4,43–4,20 м (3H, 2', 3', 4'-H), 3,87 м (2H, 5'a-, 5'b-H).

3-*N*-Метилуридин (VIIa) синтезирован по модифицированному методу [39]. Смесь 1 г (4,1 ммоль) уридина, 2 мл (20 ммоль) диметилацетата диметилформамида и 50 мл абсолютного метанола кипятили в течение 16 ч. Растворитель упаривали в вакууме досуха, остаток растворяли в 10 мл воды и раствор нейтрализовали добавлением дауэкса 50 (H<sup>+</sup>). Смолу отфильтровывали и раствор наносили на колонку с дауэксом 1×2 (OH<sup>-</sup>; 3,5×9 см), уравновешенным 30% метанолом. Продукт элюировали 30% метанолом. Элюат упаривали в вакууме досуха и остаток перекристаллизовывали из этанола. Выход 920 мг (87%), т.пл. 118–119° С. УФ-спектр:  $\lambda_{\text{макс}}^{\text{pH } 2-12}$  262 нм ( $\epsilon$  10 000).

Синтез нуклеозид-2',3'-циклофосфатов (IIIб)–(VIIб). Смесь 1 ммоль нуклеозида (IIIa)–(VIIa) и 1 ммоль дибутилоксида олова в 30 мл абсолютного метанола кипятили до полного растворения (~1 ч). После охлаждения до 20° С добавляли при перемешивании 10 ммоль три-*n*-бутиламина и 10 ммоль дифенилхлорфосфата и выдерживали реакционную смесь 1 ч при 20° С. Упаривали в вакууме досуха, к остатку добавляли 30 мл воды, перемешивали 0,5 ч при 20° С и экстрагировали хлороформом (5×30 мл). В водном слое, по данным ТСХ ( $R_f$  0,45–0,5), содержатся фениловые эфиры соответствующих нуклеозид-2'(3')-фосфатов (IIIв)–(VIIв), которые без выделения подвергали кислотному гидролизу (метод А), а в случае пиридоновых нуклеотидов — щелочному гидролизу (метод Б).

*Метод А.* К водному слою (рН 4,0–5,5) добавляли конц. HCl до рН 1 и раствор нагревали 1 ч при 50°С. После охлаждения до 20°С смесь нейтрализовали 2 М LiOH до рН 5,5 и упаривали в вакууме досуха. Остаток упаривали с абсолютным спиртом (2×20 мл), осадок отфильтровывали, промывали смесью ацетон–метанол, 9:1, до отсутствия в фильтратах реакции на Cl<sup>-</sup>-ион и получали литиевую соль нуклеозид-2' (3')-фосфата. Выход 50–70%.  $R_f$  0,07–0,10. Осадок растворяли в 10 мл воды и пропускали через колонку с даэксом 50 (H<sup>+</sup>-форма, 10 мл). Колонку промывали водой. К элюату добавляли триэтиламин до рН 5,5, упаривали досуха и упаривали с абсолютным бензолом (3×10 мл). Остаток растворяли в 10 мл абсолютного метанола, добавляли 10 ммоль DCC и оставляли на ночь при 20°С. Смесь упаривали в вакууме, к остатку добавляли 30 мл воды и 50 мл хлороформа, водный слой отделяли и экстрагировали хлороформом (4×50 мл). Водный слой наносили на колонку с DEAE-целлюлозой (CH<sub>3</sub>COO<sup>-</sup>-форма, 100 мл), колонку промывали водой (0,5 л) и элюировали в градиенте концентрации триэтиламинийацетата (0–0,1 М, общий объем 4 л, рН 5,5). Нуклеозид-2',3'-циклофосфаты элюировались в области 0,025–0,033 М концентрации буферного раствора. Фракции, содержащие продукт, упаривали, остаток растворяли в смеси ацетон–метанол, 9:1 (10 мл), и добавляли 1 мл 1 М NaI в ацетоне. Осадок центрифугировали, промывали смесью ацетон–метанол, 9:1 (3×10 мл), и сушили. Выход Na-солей 40–60%.  $R_f$  0,48–0,52.

*Метод Б.* К водному слою, содержащему фениловые эфиры 2' (3')-фосфатов (IVb), (VIb), добавляли LiOH до рН 13 и смесь выдерживали 16 ч при 20°С. Нейтрализовали концентрированной HCl до рН 7,5 и упаривали в вакууме досуха. Остаток упаривали с абсолютным спиртом (2×20 мл), отфильтровывали, промывали смесью ацетон–метанол, 9:1, до отсутствия в фильтратах реакции на Cl<sup>-</sup>-ион и получали дилитиевые соли нуклеозид-2' (3')-фосфатов с выходом 70–80%.  $R_f$  0,07–0,10. Циклизацию монофосфатов (IVb), (VIb) осуществляли как описано в методе А. Продукты выделяли ионообменной хроматографией на колонке с DEAE-целлюлозой (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-форма) в градиенте концентрации бикарбоната аммония (0–0,1 М, рН 7,5). Фракции, содержащие продукт, упаривали в вакууме досуха, упаривали с водой (5×20 мл) и лиофилизировали. Общий выход аммониевых солей (IVb), (VIb) 65–70%.  $R_f$  0,48–0,50.

По методу А получены:

*1-(β-D-Рибофуранозил)-1,2-дигидропириимидин-2-он - 2',3' - циклофосфат (IIIб).* ПМР-спектр: 8,72 дд (1H,  $J_{6,5}$  4,4,  $J_{6,4}$  2,6; 6-H), 8,41 дд (1H,  $J_{4,5}$  6,7,  $J_{4,6}$  2,6; 4-H), 6,79 дд (1H,  $J_{5,4}$  6,7,  $J_{5,6}$  4,4; 5-H), 6,04 д (1H,  $J_{1',2'}$  2,0; 1-H), 5,30–4,40 м (3H, 2'-, 3'-, 4'-H), 3,96 м (2H, 5'a-, 5'b-H). <sup>31</sup>P-ЯМР-спектр: 20,1.

*1-(β-D-Рибофуранозил)-1,4-дигидропириимидин-4-он - 2',3' - циклофосфат (Vб).* ПМР-спектр: 8,68 д (1H,  $J_{2,6}$  2,5; 2-H), 8,06 дд (1H,  $J_{6,5}$  7,7,  $J_{6,2}$  2,5; 6-H), 6,52 д (1H,  $J_{5,6}$  7,7; 5-H), 5,92 д (1H,  $J_{1',2'}$  3,5; 1-H), 5,30–4,40 м (3H, 2'-, 3'-, 4'-H), 3,95 м (2H, 5'a-, 5'b-H). <sup>31</sup>P-ЯМР-спектр: 19,9.

*3-N-Метилуридин-2',3'-циклофосфат (VIIб).* ПМР-спектр: 7,73 д (1H,  $J_{6,5}$  8,0; 6-H); 5,96 д (1H,  $J_{5,6}$  8,0; 5-H), 5,93 д (1H,  $J_{1',2'}$  2,5; 1-H), 5,19 дд (1H,  $J_{2',1'}$  2,5,  $J_{2',3'}$  6,6,  $J_{2',4'}$  6,6; 2'-H), 4,97 м (1H, 3-H), 4,34 м (1H, 4-H), 3,90 м (2H, 5'a- и 5'b-H), 3,29 с (3H, CH<sub>3</sub>).

По методу Б получены следующие соединения:

*1-(β-D-Рибофуранозил)-1,2-дигидропириимидин-2-он - 2',3' - циклофосфат (IVб).* ПМР-спектр: 7,66 м (2H, 6-H и 4-H), 6,67 м (2H, 3-H и 5-H), 6,07 д (1H,  $J_{1',2'}$  2,3; 1-H), 5,20–4,40 м (3H, 2'-, 3'-, 4'-H), 3,94 м (2H, 5'a-, 5'b-H). <sup>31</sup>P-ЯМР-спектр: 20,1.

*1-(β-D-Рибофуранозил)-1,4-дигидропириимидин-4-он - 2',3' - циклофосфат (IVб).* ПМР-спектр: 8,08 м (A<sub>2</sub>X<sub>2</sub>) (2H,  $J_{6,5}$  7,7; 2-H и 6-H), 6,65 м (A<sub>2</sub>X<sub>2</sub>) (2H,  $J_{2,3}$  7,7; 3-H, 5-H), 5,87 д (1H,  $J_{1',2'}$  3,2; 1-H), 5,20–4,40 м (3H, 2'-, 3'-, 4'-H), 3,98 м (2H, 5'a-, 5'b-H). <sup>31</sup>P-ЯМР-спектр: 19,9.

*8-Оксааденозин-2',3'-циклофосфат (VIIIб).* Циклизация аммониевой соли 8-оксааденозина-2' (3')-фосфата с помощью DCC по вышеописанной методике приводила к циклофосфату (VIIIб). Выход 73%.  $R_f$  0,50.

УФ-спектр:  $\lambda_{\text{макс}}^{\text{pH } 1}$  265 нм ( $\epsilon$  8100), 286 нм (7800);  $\lambda_{\text{макс}}^{\text{pH } 7}$  270 нм (9800),  $\lambda_{\text{макс}}^{\text{pH } 13}$  281 (11700).

ПМР-спектр: 8,13 с (1H, 2-H), 6,14 д (1H,  $J_{1',2'}$  3,5; 1-H), 5,40–4,20 м (3H, 2', 3', 4'-H), 3,92 (2H, 5'a-, 5'b-H).

2',3'-Циклофосфат N-( $\alpha,\beta$ -D-рибофуранозил)-мочевины (IXб). К раствору 2 г (5,4 ммоль) динатриевой соли уридин-2'(3')-фосфата в 100 мл 15% перекиси водорода добавляли 5 н. LiOH до pH 9,5. Раствор нагревали при 40°С, поддерживая pH 9,5–9,6 добавлением 5 н. LiOH. За ходом реакции следили по исчезновению поглощения при 260 нм. Через 4 ч реакционную смесь охлаждали до 20°С, экстрагировали эфиром (3×100 мл), водный слой нейтрализовали 1 н. HCl до pH 7,5, упаривали в вакууме до объема ~30 мл, добавляли 50 мл этанола и 750 мл ацетона и оставляли на 16 ч при 5°С. Осадок центрифугировали, отмывали от LiCl смесью этанол-эфир, 1:2, до отсутствия реакции на Cl<sup>-</sup>-ион и сушили. Остаток растворяли в 100 мл воды и наносили на колонку с дауэксом 1×2 (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-форма, объем 70 мл). Колонку промывали водой (200 мл), 0,05 М NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> (200 мл) и 0,1 М NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>. Фракции, содержащие продукт, упаривали, затем упаривали с водой (5×10 мл) и лиофилизировали. Выход 1,2 г (70%) диаммониевой соли 2'(3')-фосфата N-( $\alpha,\beta$ -D-рибофуранозил)-мочевины.  $R_f$  0,13.

Продукт (1,1 г, 3,4 ммоль) растворяли в 30 мл воды и добавляли 3 мл трибутиламина. Раствор упаривали с водой (3×20 мл) и абсолютным метанолом (5×10 мл). Остаток растворяли в 50 мл абсолютного метанола, добавляли 10 г ДСС и оставляли на 16 ч при 20°С. Раствор упаривали до небольшого объема (10 мл), смешивали со 100 мл 0,1 М NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> и экстрагировали CHCl<sub>3</sub> (5×100 мл). Водный слой упаривали в вакууме досуха, затем упаривали с водой (5×10 см) и наносили на колонку с дауэксом 1×2 (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-форма, объем 70 мл). Колонку промывали водой и элюировали циклофосфат 0,06 М NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>. Фракции, содержащие продукт, объединяли, упаривали досуха, затем упаривали с водой (5×10 мл) и лиофилизировали. Выход аммониевой соли 2',3'-циклофосфата N-( $\alpha,\beta$ -D-рибофуранозил)-мочевины 930 мг (95%).  $R_f$  0,45. Соотношение  $\alpha$ - и  $\beta$ -аномеров составляло 3:2. ПМР-спектр: 5,77 дд (0,6 H,  $J_{1',2'}$  4,5,  $J_{1',p}$  1,7; 1'-H,  $\alpha$ -аномер), 5,48 д (0,4 H,  $J_{1',2'}$  3,7; 1-H,  $\beta$ -аномер), 5,30–4,36 м (2H, 2'-H, 3'-H), 4,16 м (0,6 H, 4'-H,  $\alpha$ -аномер), 4,04 м (0,4 H, 4'-H,  $\beta$ -аномер), 4,0–3,6 м (2H, 5'a-H и 5'b-H).

При добавлении РНКазы А или неспецифической РНКазы *P. brevicompactum* [37] интенсивность сигналов протонов с хим. сдвигом 5,48 (1'-H,  $\beta$ -аномер) уменьшается. Одновременно наблюдалось появление сигнала с хим. сдвигом 5,64 д ( $J_{1',2'}$  4,4).

При выделении продукта гидролиза —  $\beta$ -аномера 3'-фосфата (IXв) — на DEAE-целлюлозе наблюдалась его апомеризация.

Нуклеозид-3'-фосфаты (IIIв–VIIв) были получены ферментативным гидролизом соответствующих циклофосфатов (IIIб) — (VIIб) РНКазой *P. brevicompactum* [35] с последующим выделением продуктов на DEAE-целлюлозе.

Авторы благодарят Н. Ш. Падиюкову (ИМБ АН СССР) за предоставление 8-оксадеозин-2'(3')-фосфата и И. П. Червина (ИХФ АН СССР) за съемку спектров ЯМР на спектрометре с частотой 360 МГц.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Witzel H. In: Progr. in Nucl. Acids Res. and Mol. Biol./Eds Davidson T. N., Cohn W. E. N. Y.—London: Acad. Press, 1963, v. 2, p. 221–238.
2. Gassen H. G., Witzel H. Eur. J. Biochem., 1967, v. 1, № 1, p. 36–45.
3. Richards F. M., Wyckoff H. W. In: The Enzymes/Ed. Boyer P. D. N. Y.: Acad. Press, 1971, v. 4, p. 647–806.
4. Benz F. W., Roberts G. C. K. In: Physico-Chemical properties of nucleic acids/Ed. Duchense I. N. Y.: Acad. Press, 1973, v. 3, p. 77–138.
5. Karpeisky M. Ya., Yakovlev G. I. Sov. Sci. Revs., Sect. D. N. Y.: Harwood academic publishers, 1981, v. 2, p. 145–257.
6. Gorenstein D. G., Wyrwicz A. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1974, v. 59, № 2, p. 718–724.

7. Pavlovsky A. G., Borisova S. N., Borisov V. V., Antonov I. V., Karpeisky M. Ya. FEBS Lett., 1978, v. 92, № 2, p. 258-262.
8. Buchner P., Blomberg F., Ruterjans H. In: Nuclear magnetic resonance spectroscopy in Mol. Biol./Eds Pulman B., Reidel D. Dordrecht, Holland: Publishing Company, 1978, p. 53-70.
9. Антонов И. В., Карпейский М. Я., Падюкова Н. Ш., Яковлев Г. И., Сахаровский В. Г. Биоорг. химия, 1979, т. 5, № 2, с. 280-288.
10. Bellmann B., Witzel H. Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem., 1981, B. 362, № 11, S. 1539-1549.
11. Карпейский М. Я., Яковлев Г. И., Сахаровский В. Г. Биоорг. химия, 1981, т. 7, № 5, с. 686-694.
12. Holy A., Smrt J. Collect. Czech. Chem. Commun., 1966, v. 31, № 4, p. 1528-1534.
13. Sajjhl R. J. Org. Chem., 1970, v. 35, № 9, p. 2881-2883.
14. Wagner D., Verheyden J. P. H., Moffat J. G. J. Org. Chem., 1974, v. 39, № 1, p. 24-30.
15. Ukita T., Funakoshi R., Hirose Y. Chem. and Pharm. Bull., 1964, v. 12, № 7, p. 828-835.
16. Kondo Y., Fourrey J.-L., Witkop B. J. Amer. Chem. Soc., 1971, v. 93, № 14, p. 3527-3529.
17. Pishel H., Holy A. Collect. Czech. Chem. Commun., 1970, v. 35, № 12, p. 3584-3596.
18. Pishel H., Holy A. Collect. Czech. Chem. Commun., 1969, v. 34, № 1, p. 89-102.
19. Lee H. J., Wigler P. W. Biochemistry, 1968, v. 7, № 4, p. 1427-1431.
20. Usher D. A., Richardson D. I., Oakenful D. G. J. Amer. Chem. Soc., 1970, v. 92, № 15, p. 4699-4712.
21. Shugar D. in: Methods in Enzymology / Eds Grossman L., Moldave K. New York - London: Acad. Press, 1967, v. XII, Part A, p. 131-137.
22. Brown D. J., Hoerger E., Mason S. F. J. Chem. Soc., 1955, № 1, p. 211-217.
23. Mason S. F. J. Chem. Soc., 1959, № 3, p. 1253-1262.
24. Павловский А. Г., Падюкова Н. Ш., Карпейский М. Я. Докл. АН СССР, 1978, т. 242, № 4, с. 961-964.
25. Priel H., Zillig W. Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem., 1965, B. 342, № 1-3, S. 73-80.
26. Wieker H. J., Witzel H. Eur. J. Biochem., 1967, v. 1, № 2, p. 251-258.
27. Карпейский М. Я., Яковлев Г. И. Биоорг. химия, 1976, т. 2, № 9, с. 1221-1230.
28. Karpeisky M. Ya., Yakovlev G. I. FEBS Lett., 1977, v. 75, № 1, p. 70-72.
29. Meadows D. H., Roberts G. C. K., Jardetzky O. J. Mol. Biol., 1969, v. 45, № 2, p. 491-511.
30. Anderson D. G., Hammes G. G., Walz F. G. Biochemistry, 1968, v. 7, № 5, p. 1637-1645.
31. Kwiatkowsky J. S., Pullmann B. Advances Heterocycl. Chem., 1975, v. 18, p. 199-335.
32. Cullies P. M., Wolfenden R. Biochemistry, 1981, v. 20, p. 3024-3028.
33. Tanford C., Roxby R. Biochemistry, 1972, v. 11, № 14, p. 2192-2198.
34. Карпейский М. Я., Дудкин С. М., Сахаровский В. Г., Шляпников С. В. В сб.: Структура и функции активных центров ферментов. М.: Наука, 1974, с. 183-203.
35. Моисеев Г. П., Бочаров А. Л., Мамаева О. К., Яковлев Г. И. Биоорг. химия, 1982, т. 8, № 9, с. 1197-1206.
36. Brown D. M., Magrath D. I., Todd A. R. J. Chem. Soc., 1952, № 6, p. 2708-2712.
37. Edelhoch N., Coleman J. J. Biol. Chem., 1956, v. 219, № 1, p. 351-363.
38. Niedballa U., Vorbruggen H. J. Org. Chem., 1974, v. 39, № 25, p. 3668-3674.
39. Zemlicka J. Collect. Czech. Chem. Commun., 1970, v. 35, № 12, p. 3572-3583.

Поступила в редакцию  
1.XII.1982

## TOPOCHEMICAL ASPECTS OF THE PYRIMIDINE SPECIFICITY OF RNASE A

KARPEISKY M. YA., MOISEEV G. P., BOCHAROV A. L., BOGDANOVA G. A.,  
MIKHAILOV S. N., YAKOVLEV G. I.

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

To get insight into the origin of pyrimidine specificity of ribonuclease A, a study of the enzyme interaction with the substrate analogs having a modified nucleobase was undertaken. Pyridine and pyrimidine cyclophosphates were obtained by phosphorylation of 2'(3')-O-dibutyl stannylidene derivatives of nonprotected nucleosides in high yields. The results of kinetic and NMR studies suggested that a substrate should be locked in *anti*-conformation in the productive enzyme-substrate complex as it was shown for the crystalline complexes of the enzyme with pyrimidine nucleotides by X-ray analysis. The interaction between carbonyl group in position 2 of substrate nucleobase and proton accepting group of the protein (NH of Thr<sup>45</sup>) was found to be a prerequisite for the specific recognition of a substrate by the enzyme. The rate constants for transformation of lactam form (slow) and lactim form (fast) of pyrimidine substrates were estimated.