



УДК 577.152.314'143

**СТЕРЕОЭЛЕКТРОННЫЕ ЭФФЕКТЫ В РЕАКЦИЯХ  
ФЕРМЕНТАТИВНОГО РАСЩЕПЛЕНИЯ ДИНУКЛЕОЗИДФОСФАТОВ  
РНКазами***Яковлев Г. И., Бочаров А. Л., Моисеев Г. П.,  
Михайлов С. К.**Институт молекулярной биологии Академии наук СССР, Москва*

Показано, что скорость ферментативного расщепления динуклеозидфосфатов под действием РНКаз находится под стереоэлектронным контролем, так как энергия химической связи элиминируемой эфирной группы с атомом фосфора зависит от конформации фосфодиэфирного фрагмента субстрата в активном центре фермента. В результате этого скорость расщепления динуклеозидфосфатов РНКазми определяется средством основания нуклеозида на 5'-конце расщепляемой фосфодиэфирной связи к связыванию в определенном участке активного центра фермента.

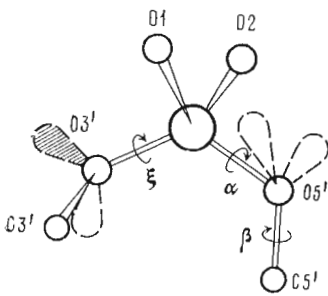
При гидролизе РНК под действием РНКазы А скорость расщепления межнуклеотидной связи, содержащей пиримидиновый нуклеозид на ее О3'-конце, зависит от природы нуклеозида на ее О5'-конце [1]. Расщепление связей пиримидин—пурин происходит быстрее, чем связей пиримидин—пиримидин. Более детально этот эффект был изучен при гидролизе динуклеозидфосфатов [2, 3]. Было обнаружено, что константа скорости расщепления межнуклеотидной связи в рядах  $CpN$  и  $UpN$ , где  $N=A, G, C, U$ , изменяется более чем в 100 раз, тогда как величина константы Михаэлиса остается практически постоянной. Модификация нуклеозида на О5'-конце, замена его бензильной или метильной группой приводит к уменьшению константы скорости при сравнительно малом повышении значения  $K_m$ . Аналогичные эффекты природы нуклеотида на О5'-конце фосфодиэфирной связи при расщеплении динуклеозидфосфатов отмечены и для других РНКаз [4—7]. Для них, как и для РНКазы А, наибольшая скорость расщепления динуклеозидфосфатов наблюдается в случае определенного нуклеозида на О5'-конце, характерного для каждого фермента.

Мы предположили, что кинетическая специфичность РНКаз к природе нуклеозида на О5'-конце фосфодиэфирной связи обусловлена стереоэлектронными эффектами, описанными ниже. Данная работа представляет экспериментальную проверку влияния стереоэлектронных эффектов на скорость реакции трансэтерификации под действием РНКаз.

Теоретический анализ электронной структуры фосфодиэфиров показал, что энергия связи эфирных атомов кислорода с атомом фосфора существенно зависит от торсионных углов  $\alpha$  и  $\zeta$  (рисунок) [8]. Этот торсионный эффект обусловлен тем, что при определенных значениях  $\alpha$  и  $\zeta$  орбитали неподеленных пар электронов атомов кислорода перекрываются с разрыхляющими  $\sigma^*$ -орбиталями соседних P—O-связей. Антиперипланарная ориентация орбитали неподеленной пары электронов одного из атомов кислорода к соседней P—O-связи ослабляет эту связь и усиливает связь с атомом фосфора рассматриваемого кислородного атома. Синперипланарная ориентация сопровождается противоположным эффектом — усилением соседней P—O-связи и ослаблением P—O-связи данного атома.

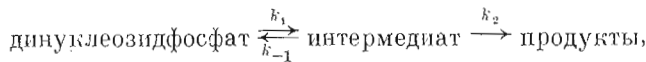
Реакция расщепления связи P—O5' в динуклеозидфосфатах протекает через образование промежуточного соединения с пентакоординированным

УрА — динуклеозидфосфонат, отличающийся от динуклеозидфосфата УрА тем, что О5'-атом рибозного остатка аденозина замещен на метиленовую группу; (*pro-S-Me*)U и (*pro-R-Me*)U — остатки уридина, у которых один из атомов водорода 5'-CH<sub>2</sub>-группы замещен на метильную группу.



Схематическое изображение фосфодиэфирного фрагмента динуклеозидфосфата в конформации *cis-gauche*,  $\alpha$   $0^\circ$  и  $\zeta$   $+60^\circ$ . Пунктиром показаны орбитали неподеленных пар электронов эфирных атомов кислорода. Заштрихованная орбиталь атома  $O3'$  антиперипланарна к  $P-O5'$ -связи. Каждая из орбиталей атома  $O5'$  синперипланарна к связям  $P-O$  фосфорильных атомов кислорода

атомом фосфора, имеющего структуру 2',3'-циклооксифосфорана, распад которого приводит к образованию соответствующих 2',3'-циклофосфата и нуклеозида [9]. Присоединение атома  $O2'$  к атому фосфора при образовании интермедиата сопровождается одновременным удлинением  $P-O5'$ -связи. Поэтому наибольшая скорость образования интермедиата будет наблюдаться для конформера, у которого энергия  $P-O5'$ -связи минимальна. В этом смысле образование интермедиата находится под стереоэлектронным контролем. Распад интермедиата также находится под стереоэлектронным контролем, так как энергетический барьер реакции элиминирования группы, связанной с  $O5'$ , определяется ориентацией орбиталей неподеленных пар атомов кислорода  $P-O-C$ -связей интермедиата, включая вновь образующуюся связь  $P-O2'-C2'$  [10–12]. Тем не менее наблюдаемая скорость расщепления динуклеозидфосфатов практически, по-видимому, определяется скоростью образования интермедиата. Константа скорости трансэтерификации ( $k$ ) для динуклеозидфосфатов, протекающей через образование интермедиата по схеме



равна

$$k = \frac{k_1 k_2}{k_1 + k_{-1} + k_2}. \quad (1)$$

Теоретические расчеты энергетического профиля реакции трансэтерификации, выполненные на примере реакции гидролиза диметилфосфата, показали [11, 12], что величины энергетических барьеров, определяющих константы скорости  $k_1$ ,  $k_{-1}$  и  $k_2$ , могут изменяться в зависимости от конформации вступающего в реакцию фосфодиэфира и образующегося интермедиата на 5–11 ккал/моль. Однако во всех случаях выполняются соотношения  $k_2 > k_{-1} \gg k_1$ . С учетом этих соотношений из уравнения (1) следует, что  $k \approx k_1$ . Таким образом, можно полагать, что скорость трансэтерификации мало зависит от конформации интермедиата, но может изменяться на несколько порядков величины в зависимости от конформации фосфодиэфирного фрагмента субстрата во время атаки атома фосфора  $O2'$ -атомом рибозы.

На основании вышеизложенного можно ожидать, что и в случае ферментативного расщепления динуклеозидфосфатов под действием РНКаз скорость расщепления будет наибольшей при определенной конформации фосфодиэфирного фрагмента, при которой энергия связи  $P-O5'$  минимальна. В то же время слабое влияние природы 5'-нуклеозида на величину константы диссоциации комплексов динуклеозидфосфатов с РНКазами, отмеченное выше, позволяет считать, что комплексы каждой РНКазы и динуклеозидфосфата гетерогенны по структуре. В части комплексов, мольная доля которой зависит от природы нуклеозида на 5'-конце фосфодиэфирной связи, динуклеозидфосфат находится в высокореакционной конформации, а в остальной части — в менее реакционной. Соответственно скорость расщепления РНКазой данного динуклеозидфосфата определяется соотношением таких мольных фракций фермент-субстратных комплексов.

В настоящее время наиболее полные данные о структуре фермент-субстратных комплексов известны для РНКазы А. Используя координаты

атомов динуклеозидфосфата УрСа с РНКазой S (РНКаза S — каталитически активный аналог РНКазы А) [13], можно найти, что двугранные углы  $C3'-O3'-P-O5'$  и  $O3'-P-O5'-C5'$  равны  $+70$  и  $+14^\circ$  соответственно. Уточнение конформации фосфодиэфирного фрагмента для УрА в комплексе с РНКазой S, выполненное расчетным способом на основании координат УрСа, показало, что соответствующие двугранные углы изменяются относительно мало [14]. На основании этих данных можно считать, что фосфодиэфирный фрагмент быстро расщепляемого динуклеозидфосфата в фермент-субстратном комплексе с РНКазой А в растворе существует преимущественно в *цис-гош*<sup>+</sup>-конформации ( $\alpha \approx 0^\circ$ ;  $\xi \approx 70-90^\circ$ ). Рентгеноструктурные исследования, выполненные для комплексов динуклеозидфосфатов СрА и УрУ с неактивным производным РНКазы S, полученным динитрофенилированием  $\epsilon$ -аминогруппы остатка Lys<sup>41</sup>, показали, что их 3'-нуклеозидный фрагмент и фосфатная группа связываются в активном центре фермента аналогично, а места связывания 5'-нуклеозида различаются [15]. Аденозиновый фрагмент СрА связывается в той же области, что и аденозиновый фрагмент УрСа, а область фиксации 5'-нуклеотида УрУ смещена примерно на 5 Å. Таким образом, для наиболее медленно расщепляемого РНКазой А динуклеозидфосфата преобладающая конформация его фосфодиэфирного фрагмента в фермент-субстратном комплексе отличается от конформации для соответствующего быстрорасщепляемого субстрата, по-видимому, только за счет разницы в величинах двугранных углов  $\alpha$ . В соответствии со сделанным выше предположением константа скорости ферментативной реакции для динуклеозидфосфатов, в том числе и для УрУ и СрУ, наиболее медленно расщепляемых РНКазой А, пропорциональна мольной фракции комплексов, структурно аналогичных комплексу РНКазы А с УрА или СрА.

Для экспериментальной проверки этой гипотезы мы считали целесообразным провести сопоставление кинетических параметров ферментативных реакций для медленно расщепляемых субстратов и их производных, для которых связывание в активном центре фермента в конформации, характерной для быстро расщепляемых субстратов, стерически затруднено.

Для субстратов РНКазы А указанная модификация динуклеозидфосфатов может быть получена заменой протона в *pro-S*-положении 5'-СН<sub>2</sub>-группы 5'-нуклеозида на метильную группу. Такая замена должна приводить к уменьшению доли комплексов с *цис-гош*<sup>+</sup>-конформацией по сравнению с немодифицированным динуклеозидфосфатом, так как при наличии метильной группы в *pro-S*-положении *цис-гош*<sup>+</sup>-конформации оказывается стерически затрудненной при значениях угла  $\beta$ , близких по величине к значению для УрА в комплексе с РНКазой А ( $\beta \approx +150^\circ$  [13]). Введение метильной группы в *pro-R*-положение той же 5'-СН<sub>2</sub>-группы должно, наоборот, несколько повышать по тем же причинам населенность *цис-гош*<sup>+</sup>-конформации. Сопоставление кинетических параметров энзиматического расщепления *pro-S*- и *pro-R*-метильных производных динуклеозидфосфатов можно проводить непосредственно только между собой. Сопоставление их с соответствующими значениями для немодифицированного динуклеозидфосфата затруднительно, так как требуется учесть различия в величине  $pK$  уходящих групп, представленных в этом случае радикалами первичного и вторичного спиртов.

Заключение о наиболее реакционной конформации динуклеозидфосфата для РНКазы А базировалось на структурных исследованиях комплексов этого фермента с аналогами субстратов. Тем не менее вывод о том, что для достижения максимальной скорости реакции динуклеозидфосфат должен находиться в *цис-гош*<sup>+</sup>-конформации, является, вероятно, общим для всех циклизующих РНКаз. Действительно, значение угла  $\xi$  определяется геометрическими параметрами фосфорибозильного фрагмента и стереохимическими требованиями для присоединения атома  $O2'$  к атому фосфора в ходе реакции образования интермедиата. Значение угла  $\alpha$  должно отвечать минимуму энергии связи  $P-O5'$  при заданном значении угла  $\xi$ . Найденное для РНКазы А значение  $\alpha \approx 0^\circ$  отвечает минимуму энергии связи  $P-O5'$ , как это следует из результатов анализа работы [8].

**Кинетические параметры реакции расщепления модифицированных динуклеозидфосфатов  $\text{Np}(pro-S-Me)U$  и  $\text{Np}(pro-R-Me)U$  под действием РНКаз различной специфичности**

Фермент	Субстрат	$k_{\text{кат}}, \text{с}^{-1}$	$K_m \cdot 10^4, \text{M}^{-1}$
Пиримидинспецифичная РНКазы А, рН 6,5	$\text{Cp}(pro-S-Me)U$ *	0,032	7,4
	$\text{Cp}(pro-R-Me)U$	1,9	14,3
	$\text{Cp}U$ **	27	37
	$\text{Up}(Me)$ *	0,41	28
Гуанилспецифичная РНКазы <i>Pen. brevicompactum</i> , рН 6,5	$\text{Cp}(pro-S-Me)U$	0,006	0,33
	$\text{Cp}(pro-R-Me)U$	1,5	0,33
Неспецифичная РНКазы <i>Pen. brevicompactum</i> , рН 5,7	$\text{Cp}(pro-S-Me)U$ *	3,5	2,56
	$\text{Cp}(pro-R-Me)U$	200	1,85

\* Кинетические параметры измерены методом рН-статирования.

\*\* Данные работы [2], рН 7.

для динуклеозидфосфата и в отсутствие фермента. Так, при  $\alpha 0^\circ$  ни одна из орбиталей неподеленных пар электронов атома  $O5'$  не располагается антиперипланарно к соседней  $P-O$ -связи (рисунок), что могло бы приводить к усилению  $P-O5'$ -связи. Напротив, каждая из указанных орбиталей расположена синперипланарно к одной из фосфорильных  $P-O$ -связей. Это должно значительно ослаблять  $P-O5'$ -связь. Ориентация  $P-O3'$ -связи такова, что влияние орбиталей неподеленных пар электронов атома  $O3'$  на  $P-O5'$ -связь может приводить только к ослаблению последней. Заметим, что это ослабление максимально при  $\xi 60^\circ$  (рисунок).

В силу приведенных соображений различие в  $k_{\text{кат}}$  для *pro-S*- и *pro-R*-метильных производных должно наблюдаться не только для РНКазы А, но и для других РНКаз. Однако, для какого из топоизомеров  $k_{\text{кат}}$  будет большим по величине, зависит в случае каждой из РНКаз от угла  $\beta$  для реакционной конформации динуклеозидфосфата в фермент-субстратном комплексе.

Все испытанные РНКазы расщепляют *pro-S*- и *pro-R*-метильные аналоги субстратов с существенно различной скоростью (таблица). При этом величины  $K_m$  для соответствующей пары субстратов различаются менее чем в 2 раза. В то же время каталитические константы скоростей для этих пар субстратов различаются в 60–250 раз. Все РНКазы расщепляют *pro-S*-метильные производные динуклеозидфосфатов существенно хуже, чем соответствующее *pro-R*-метильные производные.

Это указывает на то, что для всех РНКаз в их фермент-субстратных комплексах наиболее реакционная конформация динуклеозидфосфата одинакова.

Для РНКазы А в таблицу включены кинетические параметры реакции расщепления  $\text{Cp}U$  и  $\text{Up}(Me)$ . Сопоставление констант скоростей для  $\text{Cp}U$  и  $\text{Cp}(pro-S-Me)U$  свидетельствует о том, что отмеченный выше эффект рК уходящей группы приводит по меньшей мере к 14-кратному различию величин  $k_{\text{кат}}$ . Близкое различие в величинах  $k_{\text{кат}}$  для  $\text{Up}(Me)$  и  $\text{Cp}(pro-R-Me)U$  может рассматриваться как указание на то, что конформация фосфодиэфирного фрагмента  $\text{Up}(Me)$  в *cis-gosh*<sup>+</sup>-конформации является напряженной. Тем не менее значение  $K_m$  для  $\text{Up}(Me)$  только в 2 раза превышает соответствующую величину для  $\text{Cp}U$ . Следовательно, величина  $K_m$  определяется главным образом связыванием 3'-нуклеотидного фрагмента динуклеозидфосфатов.

Приведенные экспериментальные данные согласуются с гипотезой о том, что скорость расщепления динуклеозидфосфатов РНКазы определяется мольной фракцией фермент-субстратных комплексов, в которых фосфодиэфирный фрагмент находится в высокореакционной конформации. В этой конформации из-за стереоэлектронных эффектов энергия связи элиминируемой эфирной группы с атомом фосфора минимальна.

Гомогенные препараты пиримидинспецифичной РНКазы А, гуанилспецифичной РНКазы *Pen. brevicompactum* и неспецифичной РНКазы *Pen. brevicompactum* были получены так, как описано в работах [16–18]. Синтез 5'-метильных производных динуклеозидфосфатов описан в работе [19]. Метилловый эфир 3'-UMP приготовлен ферментативным гидролизом соответствующего циклофосфата [20].

Измерения кинетических параметров реакций расщепления модифицированных динуклеозидфосфатов проводили спектрофотометрическим методом и методом рН-статирования. Для определения концентраций и расчета скоростей расщепления 5'-метильных производных динуклеозидфосфатов молярные коэффициенты экстинкции и их изменения при протекании реакции трансэтерификации были приняты равными соответствующим значениям для немодифицированных динуклеозидфосфатов:  $\text{CpU} - \epsilon_{265} = 16\,800 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$  при рН 5,5 [21],  $\text{GpU} - \epsilon_{286} = 10\,600$  при рН 7 [22],  $\text{Up}(\text{Me}) - \epsilon_{238.5} = 9570$  [23];  $\text{CpU} - \Delta\epsilon_{286} = 1675$  при рН 5,0 и  $\Delta\epsilon_{286} = 1385$  при рН 6,5 [23],  $\text{GpU} - \Delta\epsilon_{286} = 850 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$  при рН 6,5 [22]. Кинетические измерения спектрофотометрическим методом проводили в буферных растворах, содержащих 0,05 М трис, 0,05 М ацетат натрия и 0,1 М NaCl. Необходимое значение рН устанавливали добавлением уксусной кислоты. Величину рН измеряли комбинированным электродом GK 2401c (Radiometer, Дания) на рН-метре рН-340 (СССР). Спектральные измерения проводили на спектрофотометре Cary-118 (Varian, США).

Измерения скоростей расщепления  $\text{Cp}(\text{pro-S-Me})\text{U}$  и  $\text{Up}(\text{Me})$  под действием РНКаз выполнены на рН-стате. Предварительно было установлено, что константа скорости трансэтерификации для указанных соединений много меньше, чем константа скорости гидролиза образующихся при этом циклофосфатов цитидина и уридина. Можно показать, что наблюдаемые в этом случае по скорости образования 3'-СМР и 3'-UMP константы  $k_{\text{кат}}$  и  $K_m$  относятся к трансферазному этапу реакции. Измерения скоростей образования 3'-фосфатов проводились по скорости появления кислоты, образующейся за счет вторичной ионизации фосфатных групп при рН 6,5. Измерения выполнены в 0,2 М NaCl. Автоматическое рН-статирование осуществлялось подачей в кювету 0,56 мМ раствора КОН автоматической бюреткой АБУ-12. Кюветы термостатировались при 25°С. Объем реакционной смеси составлял 2,05–2,10 мл. Объем раствора КОН, добавляемый для поддержания рН, не превышал 0,2 мл. При проведении расчетов скоростей учитывалась неполная вторичная ионизация фосфатных групп нуклеотидов при рН 6,5, при этом рК фосфатной группы было принято равным 5,9.

Мы благодарны Н. Ш. Падюковой за любезное предоставление *pro-S*- и *pro-R*-метильных производных динуклеозидфосфатов и М. Я. Карпейскому за полезные дискуссии.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. McLennan B. D., Lane B. G. Can. J. Biochem., 1968, v. 46, № 1, p. 93–107.
2. Witzel H., Barnard E. A. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1962, v. 7, № 4, p. 295–299.
3. Folman H., Wieker H. J., Witzel H. Eur. J. Biochem., 1967, v. 1, № 2, p. 243–250.
4. Osterman H. L., Walz F. G. Biochemistry, 1978, v. 17, № 20, p. 4124–4130.
5. Imazawa M., Irie M., Ukita T. J. Biochem. (Tokyo), 1968, v. 64, № 5, p. 595–602.
6. Yasuda T., Unoue Y. Biochemistry, 1982, v. 21, № 2, p. 364–369.
7. Иванова Г. С., Крупяко В. И., Безбородов А. М. Биохимия, 1976, т. 41, вып. 3, с. 482–486.
8. Gorenstein D. G., Findlay J. B., Luxon B. A., Kar D. J. Amer. Chem. Soc., 1977, v. 99, № 10, p. 3473–3479.
9. Westheimer F. H. Accounts Chem. Res., 1968, v. 1, № 1, p. 70–78.
10. Gorenstein D. G., Luxon B. A., Findlay J. B., Momii R. J. Amer. Chem. Soc., 1977, v. 99, № 12, p. 4170–4172.
11. Gorenstein D. G., Luxon B. A., Findlay J. B. J. Amer. Chem. Soc., 1977, v. 99, № 24, p. 8048–8049.

12. Gorenstein D. G., Luxon B. A., Findlay J. B. J. Amer. Chem. Soc., 1979, v. 101, № 20, p. 5869-5875.
13. Richards F. M., Wyckoff H. W. Atlas on molecular structure in biology. I. Ribonuclease-S/Eds Phillips D. R., Richards F. M. Oxford Clarendon Press, 1973.
14. Holmes R. R., Deiters J. A., Gallucci J. C. J. Amer. Chem. Soc., 1978, v. 100, № 23, p. 7393-7402.
15. Allewell N. M., Mitsui Y., Wyckoff H. W. J. Biol. Chem., 1973, v. 248, № 15, p. 5291-5298.
16. Crestfield A. M., Stein W. H., Moor S. J. Biol. Chem., 1963, v. 238, № 3, p. 618-626.
17. Безбородова С. И., Суходольская Г. В., Гуляева В. И., Ильина Т. В. Прикл. биохимия и микробиология, 1974, т. 10, № 3, с. 432-437.
18. Ильина Т. В., Безбородова С. И. Прикл. биохимия и микробиология, 1972, т. 8, № 2, с. 226-231.
19. Padyukova N. Sh., Smrt J. Coll. Czech. Chem. Commun., 1980, v. 45, № 9, p. 2550-2557.
20. Findlay D., Mathias A. P., Rabin B. R. Biochem. J., 1962, v. 85, № 1, p. 134-139.
21. Imazava M., Irie M. J. Biochem. (Tokyo), 1968, v. 64, № 5, p. 595-602.
22. Zabinski M., Walz F. G. Arch. Biochem. and Biophys., 1976, v. 175, № 2, p. 558-564.
23. Machuga E., Klapper M. H. Biochim. et biophys. acta, 1977, v. 481, № 2, p. 526-541.

Поступила в редакцию  
3.VII.1984

## STEREOELECTRONIC EFFECTS IN ENZYMIC CLEAVAGE OF DINUCLEOSIDE PHOSPHATES BY RNases

YAKOVLEV G. I., BOCHAROV A. L., MOISEYEV G. P.,  
MIKHAILOV S. N.

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

The rates of enzymatic cleavage of dinucleoside phosphates are shown to be controlled stereoelectronically. Stereoelectronic effects induce a selective weakening of the P-O5' ester bond, when the phosphodiester moiety of a dinucleoside phosphate is in the *cis, gauche*<sup>+</sup> conformation. As a result, the rate of cleavage of the dinucleoside phosphates by RNases is determined by the affinity of 5'-nucleoside for the corresponding locus of the active site of the enzyme.