



УДК 577.15.02

ИЗУЧЕНИЕ АКТИВНОГО ЦЕНТРА РИБОНУКЛЕАЗЫ
PENICILLIUM CHRYSOGENUM 152 А МЕТОДОМ ПМРСахаровский В. Г., Маркелова Н. Ю., Гейдаров Т. Г.,
Безбородова С. И.Институт биохимии и физиологии микроорганизмов
Академии наук СССР, г. Пушкино

Методом протонного магнитного резонанса изучена внеклеточная гуанилспецифичная рибонуклеаза гриба *Penicillium chrysogenum* 152 А (РНКаза Р·ch₁). В спектрах ПМР фермента выделены сигналы протонов имидазольных колец двух остатков гистидина (His-A и His-B). Определены величины $pK_{\text{как}}$ гистидинов (7,9 для His-A и 7,8 для His-B) и взаимодействующих с ними карбоксильных групп (4,5 и 3,8 соответственно). Определены константы второго порядка для процесса дейтерообмена протонов С (2)-Н имидазольных колец остатков гистидинов при рD 8,5 и 32° (2,5·10³ для His-A и 1,0·10³ моль⁻¹·мин⁻¹ для His-B). Сделан вывод о том, что остаток His-A локализован на поверхности белковой глобулы, в то время как остаток His-B частично погружен в нее. Связывание РНКазы Р·ch₁ с² ингибитором 3'-GMP вызывает увеличение $pK_{\text{как}}$ остатков гистидинов и нарушение связей между остатками гистидинов и карбоксильными группами. Постулируется локализация в области активного центра двух остатков гистидинов и двух карбоксилсодержащих остатков. Обсуждаются ионные состояния остатков гистидинов и фосфатной группы 3'-GMP в комплексе РНКазы Р·ch₁ с 3'-GMP.

Знать строение активных центров рибонуклеаз различного происхождения необходимо для понимания природы их специфичности и каталитической эффективности, а также эволюции формирования активных центров ферментов. В связи с этим большой интерес представляет изучение строения активного центра внеклеточной гуанилспецифичной рибонуклеазы гриба *Penicillium chrysogenum* 152 А (РНКаза Р·ch₁).

РНКаза Р·ch₁ обладает специфичностью к гуаниловому основанию на 3'-конце гидролизуемой 3',5'-фосфодиэфирной связи в молекуле РНК [1]. Ее молекулярный вес ~11 000; известны аминокислотный состав [2] и некоторые физико-химические свойства [3]. По данным аминокислотного анализа, в РНКазе Р·ch₁ из ароматических остатков содержится 4 остатка фенилаланина, 9 остатков тирозина и 2 остатка гистидина.

Целью данной работы было изучение электронного состояния и микроокружения остатков гистидинов в свободной РНКазе Р·ch₁ и изменения этих параметров при связывании фермента с конкурентными ингибиторами методом ПМР на предмет принадлежности остатков гистидинов к активному центру.

В слабополюной части спектра ПМР РНКазы Р·ch₁ (рис. 1, а) наблюдается интенсивный сигнал протонов остатков ароматических аминокислот и два одиночных сигнала в области, характерной для сигналов

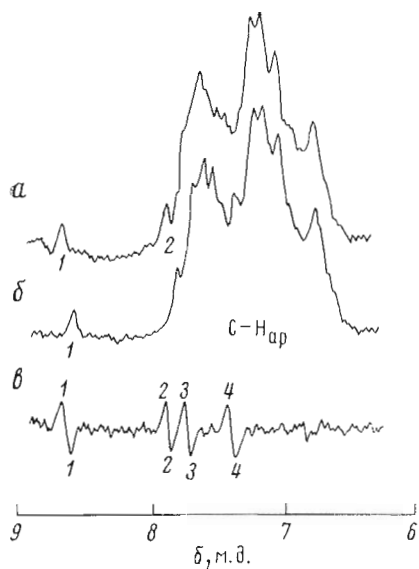


Рис. 1

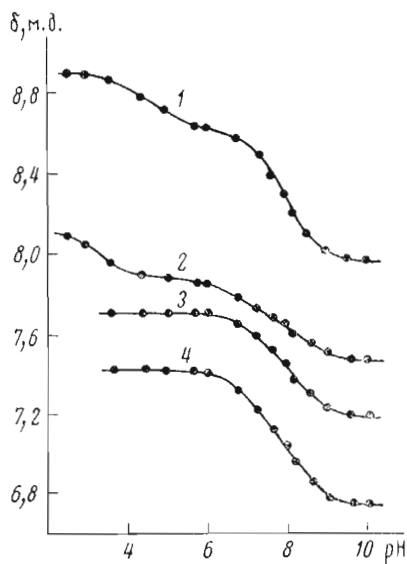


Рис. 2

Рис. 1. Разностный спектр ПМР РНКазы Р·сн₁ (а), полученный вычитанием спектра ПМР, снятого при рН 7,3 (б), из спектра, снятого при рН 5,3 (а)

Рис. 2. Химические сдвиги сигналов 1—4 (см.¹ рис. 1) спектра ПМР РНКазы Р·сн₂ как функция рН. Сплошными линиями обозначены теоретические кривые титрования

протонов С(2)-Н имидазольных колец остатков гистидинов [4]. При изменении рН среды одиночные сигналы изменяют свое положение в спектре (рис. 1, б), причем при щелочных значениях рН сигнал 2 скрывается под интенсивным сигналом протонов ароматики. Для выделения сигнала 2 получены разностные спектры ПМР белка, вызванные изменением рН среды. Как видно из рис. 1, в, в разностном спектре кроме сигналов 1 и 2 наблюдаются еще два сигнала, положение которых зависит от рН (сигналы 3 и 4 на рис. 1, в). Интенсивности этих сигналов близки интенсивностям однопротонных сигналов. Графическая зависимость положения выделенных сигналов от рН среды (рис. 2) имеет типичный вид кривых титрования сигналов от протонов С(2)-Н и С(4)-Н свободного имидазола [4], что позволило отнести их к протонам имидазольных колец двух остатков гистидинов.

Для отнесения выделенных сигналов к протонам при С(2) и С(4) имидазольных колец остатков гистидинов использовано свойство протонов при С(2) более быстро обмениваться на дейтерий по сравнению с протонами при С(4) [5]. На рис. 3 представлены разностные спектры ПМР РНКазы Р·сн₁, вызванные изменением рН среды, при выдерживании белка в тяжелой воде при температуре 32° и рD 8,5. Отчетливо просматривается понижение интенсивности сигналов 1 и 2 в процессе дейтериевого обмена, в то время как интенсивности сигналов 3 и 4 остаются неизменными. Конечные интенсивности сигналов после 3,7 сут обмена — 0,2; 0,6; 1,0 и 1,0 интенсивности однопротонного сигнала для сигналов 1, 2, 3 и 4 соответственно. Полученные результаты позволяют отнести сигналы 1 и 2 к протонам С(2)-Н имидазольных колец остатков гистидинов (His-A и His-B соответственно), а сигналы 3 и 4 — к протонам С(4)-Н. Путем математической обработки кривых титрования протонов С(2)-Н остатков гистидинов [6, 7] определены величины рК_{каж} (табл. 1).

Для характеристики микроокружения остатков гистидинов в пространственной структуре белка в растворе необходимо точное соотношение

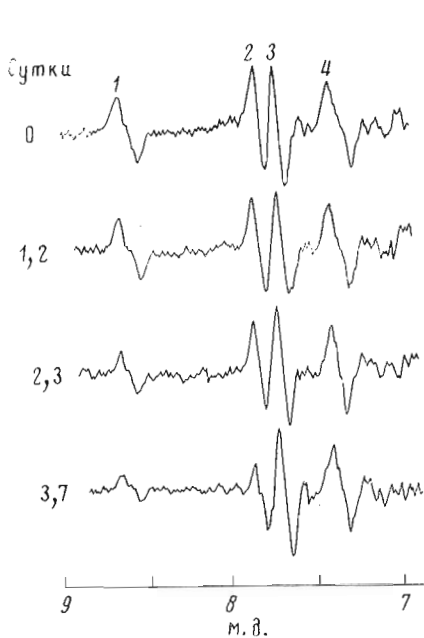


Рис. 3

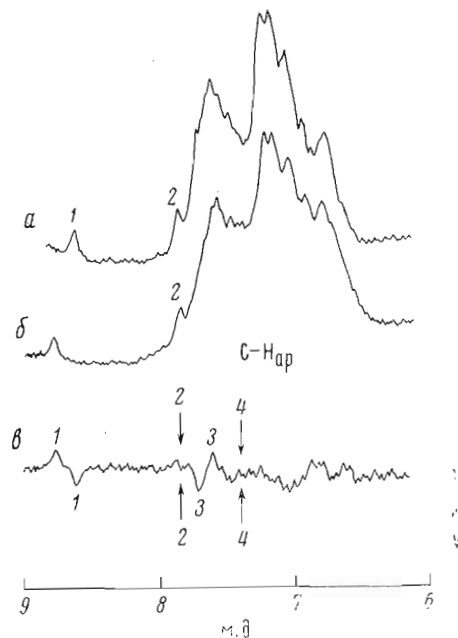


Рис. 4

Рис. 3. Разностные спектры ПМР РНКазы Р·сн₁, вызванные изменением рН среды (6,0—7,3) в процессе дейтериеобмена при рD 8,5 и температуре 32°

Рис. 4. Разностный спектр ПМР РНКазы Р·сн₁ (а), полученный вычитанием спектра ПМР свободной РНКазы Р·сн₁ (а) из спектра РНКазы Р·сн₁ (б) в присутствии 0,1 М НРО₄²⁻ (рН 6)

сигналов от протонов С(4)-Н к индивидуальным остаткам. Одним из способов соотнесения является сравнение величин $rK_{\text{каж}}$ остатков гистидинов, полученных по спектрам ПМР из кривых титрования протонов С(2)-Н и С(4)-Н [8]. Однако такой подход к отнесению сигналов 3 и 4 к протонам имидазольных колец индивидуальных остатков гистидинов в данном случае неприменим из-за близости полученных величин $rK_{\text{каж}}$ (табл. 1). Поэтому для соотнесения использованы различия во взаимодействии остатков гистидинов с неорганическим фосфатом [7]. Сравнение спектров ПМР РНКазы Р·сн₁ в 0,2 М NaCl и в 0,1 М фосфатном буфере в присутствии 0,1 М NaCl (рис. 4) показало влияние неорганического фосфата на положение сигналов 1 и 3. Это позволило отнести сигнал 3 к протону С(4)-Н остатка His-A, а сигнал 4 — к протону С(4)-Н остатка His-B.

Оценка локального окружения остатков гистидинов РНКазы Р·сн₁ проводилась путем сравнения величин $rK_{\text{каж}}$ и химических сдвигов сигналов от протонов имидазольных колец с аналогичными параметрами для остатков гистидинов панкреатической РНКазы А [9], расположение которых в пространственной структуре белка известно [10]. Для сравнения использовалось новое отнесение сигналов спектра ПМР РНКазы А к протонам имидазольных колец остатков гистидинов активного центра [11—14].

Величины химических сдвигов сигналов протонов С(2)-Н и С(4)-Н остатка His-A в кислой и щелочной области рН (табл. 1) близки аналогичным величинам для свободного имидазола и остатка His-105 РНКазы А, который расположен на поверхности белковой глобулы (табл. 2). На основании этого можно считать, что имидазольное кольцо остатка His-A также локализовано на поверхности глобулы. Оба сиг-

Таблица 1

$pK_{\text{каж}}$ и химические сдвиги (м. д.) выделенных сигналов спектров ПМР РНКазы Р-сн₁ (см. рис. 1) при разных рН

Сигналы	δ при рН		$pK'_{\text{каж}}$	$pK''_{\text{каж}}$
	3	10		
1[C(2)-H His-A]	8,90	7,95	7,9	4,5
2[C(2)-H His-B]	8,10	7,45	7,8	3,8
3[C(4)-H His-A]	7,70	7,20	7,9	0
4[C(4)-H His-B]	7,40	6,75	7,8	0

Примечание. $pK'_{\text{каж}}$ и $pK''_{\text{каж}}$ — отрицательные логарифмы констант ионизации остатков гистидинов и близлежащих титрующихся групп соответственно.

Таблица 2

$pK_{\text{каж}}$ и химические сдвиги (м. д.) протонов имидазольных колец свободного имидазола * [6] и РНКазы А [9] **

	$\delta_{\text{C}(2)\text{-H}}$ при рН		$\delta_{\text{C}(4)\text{-H}}$ при рН		$pK'_{\text{каж}}$
	3	9	3	9	
Имидазол	8,90	7,90	7,66	7,30	7,20
His-105 РНКазы А	9,06	8,00	7,80	7,30	6,7
His-119 РНКазы А ***	9,10	8,10	7,40	6,94	6,3
His-12 РНКазы А ***	9,34	8,00	7,19	6,95	6,0
His-48 РНКазы А	8,54	—	7,00	7,16	—

* Значения химических сдвигов протонов свободного имидазола взяты из кривых зависимости их от рН в [6].

** Химические сдвиги пересчитаны относительно гексаметилдисилоксана как внешнего стандарта.

*** Данные для His-119 и His-12 РНКазы А приведены с учетом нового отнесения сигналов [11—14].

Таблица 3

Константы ингибирования гидролиза GrA РНКазой Р-сн₁ некоторыми лигандами

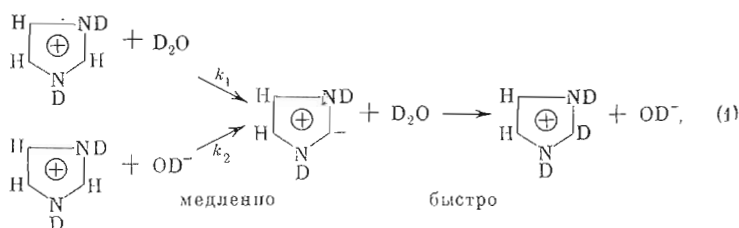
Лиганд	$K_i \cdot 10^4$, М	Лиганд	$K_i \cdot 10^4$, М
3'-GMP	0,125	Инозин	1,040
5'-GMP	0,253	Дезоксигуадозин	1,040
Гуанозин	0,570	Гуанин	1,420
5'-IMP	0,780	НРО ₄ ²⁻	0,900
		3'-CMP	8,300

нала His-B сдвинуты в сильное поле во всем интервале рН по сравнению с сигналами His-A (табл. 1). Подобного рода сдвиг в сильное поле сигналов протонов имидазольного кольца наблюдался для остатка His-48 панкреатической РНКазы А, который погружен в белковую глобулу [10, 15]. Это позволяет думать, что имидазольное кольцо остатка His-B РНКазы Р-сн₁ ориентировано внутрь глобулы. Сдвиг в сильное поле сигналов протонов имидазольного кольца His-B может быть обусловлен или влиянием анизотропии кольцевого тока ароматических остатков [15], или анизотропией карбонильной связи полипептидной цепи белка. Возможно также влияние анизотропии близлежащего отрицательного заряда [7].

Кривые титрования групп С(2)-Н остатков гистидинов РНКазы Р·сн₁ (рис. 2, 1, 2) искажены вследствие влияния соседних титрующихся групп [6, 7]. Величины $pK_{\text{каж}}$ этих групп (табл. 1) указывают на принадлежность их к карбоксильным группам. Анализ кривых титрования групп С(4)-Н остатков гистидинов РНКазы Р·сн₁ (рис. 2, 3, 4) показал хорошее соответствие их формы теоретической кривой титрования одной титрующейся группы. Это указывает на расположение карбоксильных групп со стороны С(2)-углеродных атомов имидазольных колец остатков гистидинов. Наблюдаемые различия в окружении групп С(2)-Н и С(4)-Н возможны только при их фиксированной ориентации относительно белковой глобулы.

Полученные величины $pK_{\text{каж}}$ остатков гистидинов РНКазы Р·сн₁ (табл. 1) превышают величину $pK_{\text{каж}}$ свободного имидазола (табл. 2). Можно предположить, что высокое значение $pK_{\text{каж}}$ остатков гистидинов РНКазы Р·сн₁ обусловлено ионным взаимодействием имидазольных колец с отрицательно заряженными карбоксильными группами. Вполне возможно, что именно эти карбоксильные группы искажают форму кривых титрования сигналов групп С(2)-Н остатков гистидинов в кислой области рН (рис. 2). Тогда отсутствие влияния карбоксильных групп на форму кривых титрования групп С(4)-Н должно означать, что между соответствующей карбоксильной группой и атомом азота в первом положении имидазольного кольца существует взаимодействие (рис. 9, а).

Процесс дейтерообмена протона С(2)-Н имидазольного кольца идет по схеме [5]:



для которого

$$k_{\text{набл}} = (k_1 \cdot [\text{D}_2\text{O}] \cdot [\text{D}^+] + k_2 \cdot K_{\text{D}_2\text{O}}) / (k_a + [\text{D}^+]), \quad (2)$$

где $k_{\text{набл}}$ — константа скорости псевдопервого порядка,

$$\begin{aligned}
 K_a &= [\text{Im}] \cdot [\text{D}^+] / [\text{Im}^{\oplus}]; \\
 K_{\text{D}_2\text{O}} &= [\text{D}^+] \cdot [\text{OD}^-] / [\text{D}_2\text{O}].
 \end{aligned}$$

Позднее на примере низкомолекулярных производных гистидина было показано [16]: 1) катализ дейтерообмена молекулами D_2O значительно слабее катализа ионами OD^- , и им можно пренебречь; тогда

$$k_{\text{набл}} = k_2 \cdot K_{\text{D}_2\text{O}} / (k_a + [\text{D}^+]), \quad (3)$$

2) величина k_2 зависит от зарядового окружения имидазольного кольца. Влияние зарядового окружения реализуется по электростатическому механизму, увеличивая или уменьшая вероятность атаки ионом OD^- имидазольного кольца.

При исследовании дейтерообмена протонов С(2)-Н гистидиновых остатков в белках кроме электростатических препятствий атаке ионом OD^- возможны стерические препятствия, обусловленные различной доступностью имидазольных колец растворителю.

Как показало изучение локального окружения остатков гистидинов РНКазы Р·сн₁ (рис. 9, а, табл. 1), зарядовое окружение обоих имидазольных колец в этом белке сходно. Поэтому РНКазы Р·сн₁ является

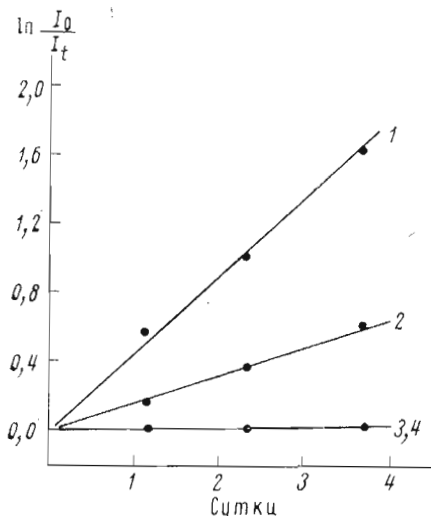


Рис. 5

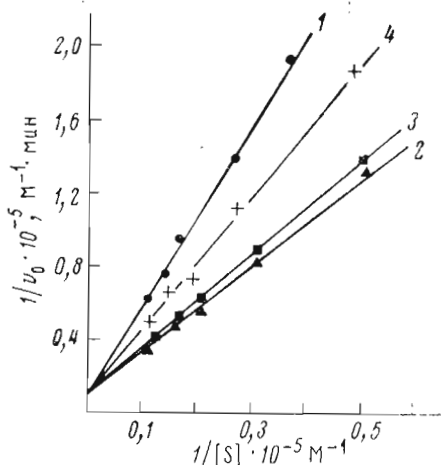


Рис. 6

Рис. 5. Зависимость величин натурального логарифма обратных приведенных интенсивностей сигналов 1—4 спектра ПМР РНКазы Р·сн₁ от времени дейтерообмена при рD 8,5 и 32°

$$k_{\text{набл}} = \frac{1}{t} \ln \frac{I_0}{I_t};$$

$$k_{\text{набл}} = 0,45 \pm 0,02 \text{ и } 0,15 \pm 0,01 \text{ сут}^{-1}$$

для сигнала 1 и 2 соответственно

Рис. 6. Зависимость $1/v_0$ гидролиза GrA РНКазой Р·сн₁ от $1/S$ без ингибитора (1) и в присутствии: 3'-GMP (2), HPO_4^{2-} (3) и 3'-CMP (4). Условия эксперимента в тексте

удобным объектом для проверки возможности влияния стерических факторов на величину k_2 .

Изучение кинетики дейтерообмена протонов С(2)-Н сигналов 1 и 2 остатков гистидинов РНКазы Р·сн₁ по изменению интенсивностей (рис. 5) позволило определить величины $k_{\text{набл}}$, из которых по уравнению (3) рассчитаны значения k_2 ($2,5 \cdot 10^3$ для His-A и $1,0 \cdot 10^3$ моль⁻¹·мин⁻¹ для His-B). Величина k_2 для His-A близка величине k_2 для имидазолилуксусной кислоты ($2,9 \cdot 10^3$ моль⁻¹·мин⁻¹ при 35° [16]), моделирующей зарядовое окружение имидазольных колец остатков гистидинов в РНКазе Р·сн₁. Это согласуется с выводом об ориентации имидазольного кольца His-A в растворитель. Меньшая величина k_2 для His-B сравнительно с His-A свидетельствует о наличии влияния стерических факторов на величину k_2 и подтверждает предположение о том, что имидазольное кольцо His-B частично погружено в белковую глобулу (рис. 9, а).

Для выбора наиболее эффективных ингибиторов при определении принадлежности остатков гистидинов РНКазы Р·сн₁ к активному центру изучено ингибирование ферментативного расщепления фосфодиэфирной связи GrA некоторыми нуклеотидами и их аналогами. В результате установлено, что все использованные соединения обладают конкурентным типом ингибирования (рис. 6). Из сравнения полученных величин констант ингибирования (табл. 3) следует, что наибольшим сродством к ферменту обладает 3'-GMP. Кроме того, сравнение величин констант ингибирования для 3'-GMP и его аналогов показывает, что изменение положения фосфатной группы в рибозном кольце нуклеотида, ее наличие или отсутствие, а также модификация рибозного кольца и основания нуклеотида влияют на сродство ингибитора к ферменту. На основании этого можно полагать, что все рассматриваемые фрагменты нуклеотида связываются

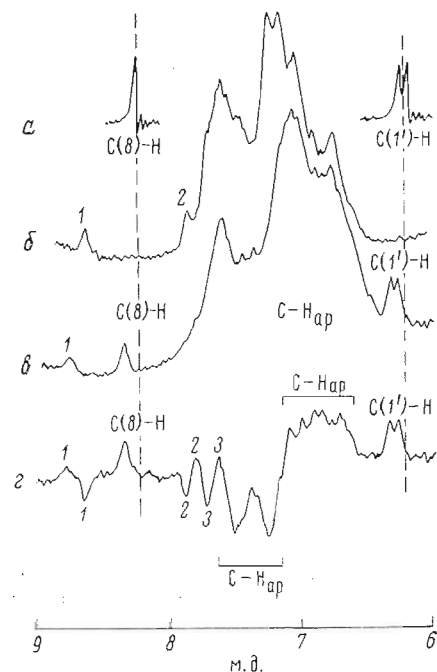


Рис. 7

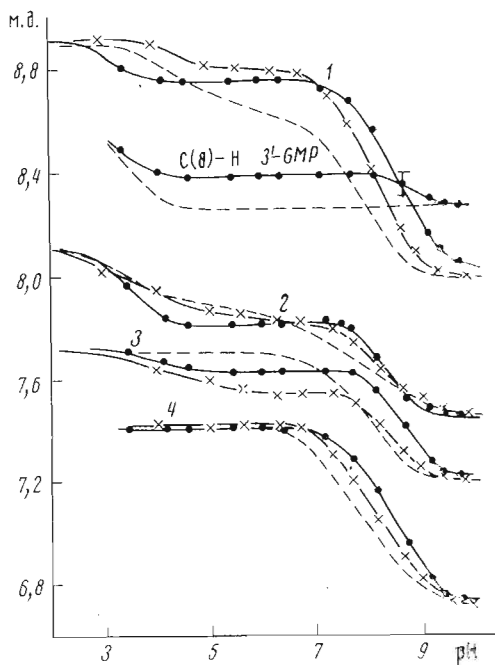


Рис. 8

Рис. 7. Слабополяризованная часть спектров ПМР 3'-GMP (а), РНКазы Р·сн₁ (б), РНКазы Р·сн₁ в присутствии 3'-GMP (1 : 2) (в) и разностный спектр ПМР, вызванный комплексобразованием (г). рН 6 (отнесение сигналов 1—4 см. в тексте). Условия съемки спектров в тексте

Рис. 8. Химические сдвиги сигналов спектров ПМР комплексов РНКазы Р·сн₁ с НРРО₄²⁻ (0,1 М) (x) и с 3'-GMP (1,5·10⁻² М) (•) как функция рН. (Отнесение сигналов 1—4 см. в тексте). Сплошные линии — теоретические кривые титрования, пунктирные — зависимость химических сдвигов тех же сигналов в спектрах свободных РНКазы Р·сн₁ и 3'-GMP от рН

с функциональными группами активного центра РНКазы Р·сн₁. Важно отметить, что неорганический фосфат обладает значительным средством к ферменту (табл. 3) и связывается конкурентно в активном центре.

В разностном спектре ПМР РНКазы Р·сн₁, вызванном связыванием фермента с 3'-GMP (рис. 7), наблюдается уширение и сдвиг в слабое поле сигнала от протона С(2)-Н His-A. Синхронно сдвигается в сильное поле сигнал протона С(4)-Н этого же остатка. В сильное поле сдвигается сигнал протона С(2)-Н His-B. В спектре ПМР нуклеотида при связывании также наблюдается сдвиг в слабое поле сигнала протона С(8)-Н гуанилового основания и сигнала от протона С(1')-Н кольца рибозы (рис. 7, табл. 4).

Уширение сигнала протона С(2)-Н His-A при комплексобразовании обусловлено, вероятно, медленным обменом между двумя состояниями фермента — свободным и ингибиторсвязанным (время жизни комплекса > 0,01с).

Наблюдаемые изменения в спектре белка при комплексобразовании указывают на изменение микроокружения остатков гистидинов, которое может быть обусловлено или непосредственным взаимодействием этих остатков с ингибитором, или лигандиндуцированным конформационным переходом в молекуле белка. Для определения природы наблюдаемых изменений в спектре проведено титрование фермент-ингибиторных комплексов, позволившее построить кривые титрования сигналов групп С(2)-Н и С(4)-Н остатков гистидинов и протона С(8)-Н 3'-GMP (рис. 8). Математическим анализом полученных кривых определены величины

$pK_{\text{каж}}$ и химические сдвиги (м. д.) сигналов ПМР комплексов РНКазы Р·сн₁ с лигандами

Лиганд	РНКазы Р·сн ₁							Лиганд		
	His-A				His-B			$\delta\Delta^*$		
	$\Delta\delta^*$		pK'	pK''	$\Delta\delta^*$		pK'	pK''	C(8) H	C(1')-H
C(2)-H	C(4)-H	C(2)-H			C(4)-H					
Свободный фермент	—	—	7,9	4,5	—	—	7,8	3,8	—	—
НРО ₄ ²⁻	-0,17	+0,17	8,2	4,7	0	0	8,0	4,1	—	—
3'-GMP	-0,12	+0,10	8,6	0	+0,05	0	8,4	0	-0,15	-0,05

* рН 6.

$pK_{\text{каж}}$ остатков гистидинов (табл. 4), а по сигналам протонов нуклеотида (рис. 8) — область существования комплекса во всем интервале рН.

Аналогичное по направлению и близкое по величине влияние неорганического фосфата и 3'-GMP на $pK_{\text{каж}}$ остатка His-A (табл. 4) указывает на определяющую роль фосфатной группы нуклеотида в изменении электронного состояния His-A при образовании комплекса. Наблюдаемый сдвиг сигналов протонов His-A при связывании РНКазы Р·сн₁ с 3'-GMP и НРО₄²⁻ (табл. 4) свидетельствует о непосредственном взаимодействии фосфатной группы нуклеотида с имидазольным кольцом His-A. При этом

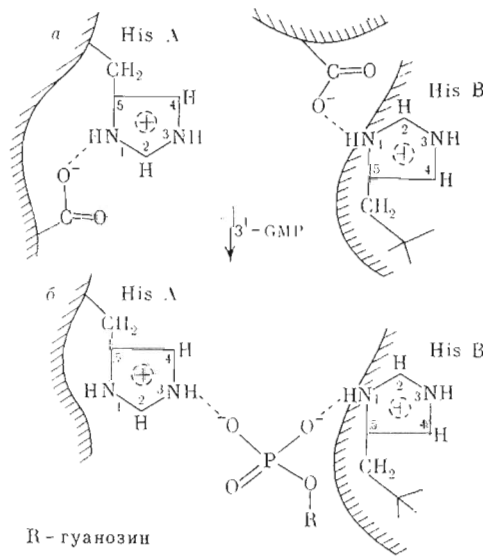


Рис. 9. Схематическое изображение микроокружения имидазольных колец остатков гистидинов свободной РНКазы Р·сн₁ (а) и в комплексе с 3'-GMP (б). Линиями со штрихами обозначена поверхность белковой глобулы

сходное влияние фосфатной группы нуклеотида на химические сдвиги групп C(2)-H и C(4)-H His-A (табл. 4) говорит о том, что фосфатная группа связывается с атомом азота в третьем положении имидазольного кольца His-A (рис. 9, б). Отсутствие дополнительных перегибов на кривых титрования протонов His-A в интервале рН 4—7 для комплекса

РНКазы $P \cdot ch_1$ с 3'-GMP (рис. 8) свидетельствует об отсутствии в окружении His-A карбоксильной группы в противоположность свободному белку. Дополнительные перегибы при значениях $pH < 4$ соответствуют наиболее вероятно распаду комплекса, что следует из сравнения этих кривых с аналогичной кривой протона C(8)-H 3'-GMP (рис. 8). Данное наблюдение позволяет заключить, что образование комплекса РНКазы $P \cdot ch_1$ с 3'-GMP разрушает первоначальную связь остатка His-A с близлежащей карбоксильной группой.

В случае His-B в присутствии неорганического фосфата и 3'-GMP наблюдается увеличение $pK_{каж}$ (табл. 4), что, как и в случае His-A, предполагает значительную роль фосфатной группы 3'-GMP в изменении электронного состояния имидазольного кольца этого остатка при образовании комплекса РНКазы $P \cdot ch_1$ с 3'-GMP. Однако влияние неорганического фосфата и 3'-GMP на микроокружение остатка His-B проявляется по-разному. В присутствии неорганического фосфата не наблюдается изменения формы кривых титрования групп C(2)-H и C(4)-H этого остатка, что указывает на неизменность его окружения, в то время как в присутствии 3'-GMP влияние близлежащей карбоксильной группы на форму кривой титрования группы C(2)-H исчезает (рис. 8, табл. 4) аналогично His-A. Перегиб на кривой титрования группы C(2)-H His-B в кислой области pH (рис. 8), как и в случае His-A, наиболее вероятно обусловлен распадом комплекса.

Наблюдаемое различие в окружении остатка His-B для двух комплексов позволяет предположить, что изменение микроокружения этого остатка при связывании РНКазы $P \cdot ch_1$ с 3'-GMP вызвано связыванием нуклеозидного фрагмента нуклеотида в активном центре белка. Однако для подтверждения этого предположения необходимы дополнительные экспериментальные результаты.

При связывании РНКазы $P \cdot ch_1$ с 3'-GMP кроме обсуждаемых выше изменений в спектре белка наблюдается изменение формы сигнала протонов остатков ароматических аминокислот (рис. 7, б, в). В разностном спектре ПМР РНКазы $P \cdot ch_1$, вызванном связыванием белка с 3'-GMP (рис. 7, г), выделен интенсивный сигнал дублетного характера, относящийся к протонам остатков тирозина или фенилаланина. Сдвиг сигнала при комплексообразовании может быть обусловлен или гидрофобным взаимодействием ароматического остатка и основания нуклеотида, или изменением окружения ароматического остатка в результате лигандиндуцированного конформационного перехода.

Наличие слабopольного сдвига сигнала C(8)-H основания нуклеотида при комплексообразовании 3'-GMP с РНКазой $P \cdot ch_1$ (табл. 4) говорит о вероятности гидрофобного взаимодействия между основанием нуклеотида и ароматическим остатком. Однако нельзя не учитывать возможность изменения конформации нуклеотида при связывании, что также может привести к наблюдаемому эффекту.

Суммируя результаты анализа микроокружения остатков гистидинов в молекуле свободной РНКазы $P \cdot ch_1$ и комплекса ее с 3'-GMP (рис. 9), можно сделать вывод о принадлежности активному центру фермента двух остатков гистидинов и двух карбоксилсодержащих аминокислотных остатков. Кроме того, связывание РНКазы $P \cdot ch_1$ с 3'-GMP вызывает изменение химического окружения остатка тирозина или фенилаланина, выяснение природы которого требует дальнейших исследований.

Сопоставление величин $pK_{каж}$ остатков гистидинов РНКазы $P \cdot ch_1$ в комплексе с 3'-GMP (табл. 4) и интервала pH существования комплекса (рис. 8) свидетельствует о протонированном состоянии остатков гистидинов в комплексе. Что касается ионного состояния фосфатной группы 3'-GMP в комплексе, то в кинетических исследованиях комплексов РНКазы T_1 с гуаниловыми нуклеотидами [17—21] сделан вывод о ее моноанионном состоянии. Однако в этих работах не учитывалась возможность

понижения $pK_{\text{каж}}$ перехода фосфатной группы из дианионного состояния в моноанионное при взаимодействии ее с положительно заряженными группами белка. В более поздней работе по изучению комплексов пап-креатической РНКазы А с пиримидиновыми нуклеотидами показано, что взаимодействие фосфатной группы нуклеотида с положительно заряженными остатками гистидинов вызывает понижение $pK_{\text{каж}}$ этого перехода до 4,4 [22].

Отсутствие перегибов на кривых титрования сигналов протонов имидазольного кольца остатка His-A в комплексе РНКазы Р·ch₁ с 3'-GMP в интервале рН 5—7 (рис. 8, 1, 3) указывает на отсутствие влияния близлежащих титрующихся групп, имеющих константу ионизации в этом интервале рН. Перегибы на кривых наблюдаются лишь в области рН 4,5 (рис. 8). Следовательно, pK перехода фосфатной группы нуклеотида из состояния дианиона в моноанион в комплексе не превышает 4,5, т. е. фосфатная группа 3'-GMP в комплексе находится в дианионном состоянии (рис. 9, б).

Экспериментальная часть

В работе использовали препарат свободного от фосфата и солей фермента, полученного по описанной ранее схеме [1]. 3'-GMP получали гидролизом 2',3'-гуанозинциклофосфата исследуемой РНКазой Р·ch₁. Полноту гидролиза контролировали по изменению спектра ПМР циклофосфата во времени. После исчерпывающего гидролиза полученных 3'-GMP использовали для связывания с ферментом без дополнительной очистки.

2',3'-Гуанозинциклофосфат синтезировали по методу [23] из 2'(-3')-GMP (Reanal, Венгрия). Дейтерированная орто-фосфорная кислота («Изотоп», СССР) использовалась без дополнительной очистки. Концентрацию орто-фосфорной кислоты определяли титрованием раствором щелочи по стандартной методике.

При определении констант ингибирования в качестве субстрата использовали GrA ($1 \cdot 10^{-4}$ — $1 \cdot 10^{-5}$ М) фирмы Serva (ФРГ), в качестве ингибиторов — NaH_2PO_4 классификации х. ч. ($5 \cdot 10^{-5}$ М), 5'-GMP, 5'-IMP, гуанозин, гуанин, инозин, дезоксигуанозин ($5 \cdot 10^{-5}$ М) фирмы Reanal (Венгрия) и 3'-CMP ($5 \cdot 10^{-5}$ М). K_i определяли методом двойных обратных величин Лайнуивера и Берка [24]. Начальные скорости гидролиза субстрата ферментом в присутствии и в отсутствие ингибитора измеряли с помощью метода разностной спектроскопии в УФ-свете на спектрофотометре Optika Milana (Италия). Относительная погрешность определения начальной скорости гидролиза $\leq 3\%$.

Для снятия спектров ПМР РНКазы Р·ch₁ $5 \cdot 10^{-3}$ М раствор белка готовился растворением лиофилизированного препарата белка в 98% тяжелой воде фирмы «Изотоп» (СССР) в присутствии 0,2 М NaCl. Величину рН измеряли до и после съемки спектра ПМР непосредственно в ампуле с помощью специально приготовленных стеклянных микроэлектродов на рН-метре типа ЛПУ-01 (СССР). Спектр считался достоверным, если оба измерения расходились не более чем на 0,04 ед. рН. Приведенные на графиках величины рН непосредственно считывались со шкалы рН-метра, и поправки на изотопный эффект тяжелой воды не вводились [25].

Величины $pK_{\text{каж}}$ остатков гистидинов и соседних титрующихся групп определяли путем математической обработки кривых титрования протонов имидазольных колец на ЭВМ марки «Мир» (СССР) по методу [7].

Спектры ПМР снимали на приборе типа Varian-NA 100D (США) при температуре 32° с использованием накопителя спектров типа C-1024 (США). В качестве внутреннего стандарта использовали сигнал протонов остаточной воды в D₂O. Химический сдвиг протонов воды в условиях эксперимента не зависит от рН среды и относительно сигнала протонов

гексаметилдисилоксана как внешнего стандарта составляет 5 м.д. при 32°. Величины химических сдвигов на графиках и спектрах приведены в миллионных долях относительно гексаметилдисилоксана как внешнего стандарта.

Разностные спектры ПМР получали с использованием накопителя спектров типа С-1024. Для этого на базе самописца спектрометра был изготовлен электрический пантограф, позволяющий переносить непосредственно с бланка накопленный спектр белка в память накопительного устройства. Такая методика позволяет многократно использовать один и тот же спектр для более точного определения положения в спектре выделяемого сигнала (не ниже точности определения положения в спектре одиночных сигналов протонов С(2)-Н имидазольных колец остатков гистицинов). Оценку интенсивностей сигналов в разностных спектрах ПМР проводили взвешиванием. Интенсивности каждого сигнала усреднялись не менее чем из трех опытов по получению разностного спектра. Относительная ошибка определения интенсивности $\leq 10\%$.

Дейтерообмен протонов С(2)-Н имидазольных колец остатков гистицинов проводили выдерживанием РНКазы Р·ch₁ в тяжелой воде при рD 8,5 и температуре 32°. За скоростью дейтерообмена следили по изменению интенсивностей сигналов в разностном спектре ПМР, вызванном изменением рН среды.

В заключение авторы благодарят д-ра хим. наук М. Я. Карпейского, канд. хим. наук С. М. Дудкина, канд. физ.-мат. наук Г. И. Яковлева за критическое обсуждение материалов работы и Б. А. Чубарова за изготовление пантографического устройства, необходимого для получения разностных спектров ПМР.

ЛИТЕРАТУРА

1. Безбородова С. И., Маркелова Н. Ю., Гуляева В. И. (1975) Биохимия, 40, 592—597.
2. Безбородова С. И., Грященко В. М., Маркелова Н. Ю. (1973) Изв. АН СССР. Сер. биол. наук, 38, 336—341.
3. Маркелова Н. Ю., Безбородова С. И. (1975) в сб. Биологические науки, 5, 86—91.
4. Bradbury J. H., Scheraga H. A. (1966) J. Amer. Chem. Soc., 88, 4240—4246.
5. Vaughan J. D., Muchrabi Z., Wu E. C. (1970) J. Org. Chem., 35, 1141—1145.
6. Sachs D. H., Schechter A. N., Cohen J. S. (1971) J. Biol. Chem., 246, 6576—6580.
7. Cohen J. S., Griffin J. H., Schechter A. N. (1973) J. Biol. Chem., 248, 4305—4310.
8. King N. L. R., Bradbury J. H. (1971) Nature, 229, 404—406.
9. Карпейский М. Я., Дудкин С. М., Сахаровский В. Г., Шляпников С. В. (1974) в сб. Структура и функции активных центров ферментов, с. 183—203, «Наука», М.
10. Richards F. M., Wysocki H. W. (1971) Enzymes, IV, 647—806.
11. Дудкин С. М., Сахаровский В. Г., Карпейский М. Я., Яковлев Г. И. (1975) Докл. АН СССР, 221, 740—743.
12. Patel D. J., Cannel L. L., Bovey F. A. (1975) Biopolymers, 14, 987—997.
13. Markley J. L. (1975) Biochemistry, 14, 3546—3554.
14. Bradbury J. H., Teh J. S. (1975) J. Chem. Soc. Chem. Commun., 936—937.
15. Meadows D. H., Roberts G. C. K., Jardetzky O. (1969) J. Mol. Biol., 45, 491—511.
16. Bradbury J. H., Chapman B. E., Pellegrino F. A. (1973) J. Amer. Chem. Soc., 95, 6139—6140.
17. Sato S., Egami F. (1965) Biochem. Z., 342, 437—448.
18. Irie M. (1966) J. Biochem., 61, 550—557.
19. Iida S., Ooi T. (1969) Biochemistry, 8, 3897—3901.
20. Oshima T., Imahory K. (1971) J. Biochem., 69, 987—990.
21. Takahashi K. (1972) J. Biochem., 72, 1469—1481.
22. Gorenstein D. G., Wyrwicz A. (1973) Biochem. and Biophys. Res. Commun., 54, 976—982.
23. Schugar D. (1967) Methods Enzymology, 12a, 131—133.
24. Lineweaver M., Burk D. (1934) J. Amer. Chem. Soc., 56, 658—664.
25. Roberts G. C. K., Meadows D. H., Jardetzky O. (1969) Biochemistry, 8, 2053—2056.

Поступила в редакцию
19.III.1976

PMR STUDIES ON THE ACTIVE SITE OF RIBONUCLEASE
PENICILLIUM CHRYSOGENUM 152 A

SAKHAROVSKY V. G., MARKELOVA N. Yu., GAIDAROV T. G.,
BEZBORODOVA S. I.

*Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms,
Academy of Sciences of the USSR, Pushchino*

The aromatic region of the proton NMR spectra of guanylo-RNase from *Penicillium chrysogenum* 152 A (RNase P·ch₁) was compared with that in spectra taken in the presence of enzyme inhibitors PO₄²⁻ and 3'-GMP. Four pH-dependent resonances were separated from the main aromatic envelope by the difference technique and attributed to imidazole ring protons of the two histidine residues. The apparent ionization constant were found to be 7.9 for His-A, 7.8 for His-B, 4.5 and 3.8 for carboxyl groups which interact with them. The second-order rate constants of H-D exchange of the histidine C-2H imidazole ring protons have been determined at 32° and pH 8.5 being equal to 2.5·10³ or His-A and 1.1·10³ mol⁻¹·min⁻¹ for His-B. The data obtained allow to believe that His-A is located on the enzyme surface, whilst His-B is embedded within the protein interior. The 3'-GMP binding to RNase P·ch₁ is accompanied by increase in pK_a of histidine residues and disappearance of their interaction with nearby carboxyl groups. These experiments permit to propose the involvement of the two histidines and two carboxyls in the enzyme active site. The ionic states of the active site groups in the enzyme-inhibitor complex are also discussed.
