



УДК 577.155.04

МОДИФИКАЦИЯ РИБОНУКЛЕАЗЫ А
ПИРИДОКСАЛЬ-5'-ФОСФАТОМ И ЕГО АНАЛОГАМИ**Борисова С. Н., Дудкин С. М., Шляпников С. В.,
Аврамова З. В., Картейский М. Я.**Институт молекулярной биологии Академии наук СССР,
Москва*

Изучено взаимодействие рибонуклеазы А, рибонуклеазы S, рибонуклеазы Р и S-белка с пиридоксаль-Р, а также рибонуклеазы А с 5'-дезоксипиридоксаль-Р, пиридоксаль-5'-сульфатом и 5'-дезоксипиридоксаль-Р-этилфосфоэстером. Показано, что специфичность модификации аминогрупп остатков лизина рибонуклеазы пиридоксаль-Р определяется тремя основными факторами: наличием фосфатного остатка в 5'-положении пиридоксаль-Р; расстоянием между центром связывания фосфата пиридоксаль-Р и модифицируемой аминогруппой; стабильностью продуктов реакции, определяемой локальным белковым окружением. Предложен механизм модификации ϵ -аминогрупп остатков лизина, расположенных вблизи активного центра ферментов, катализирующих превращение производных фосфорной кислоты.

Эффективным подходом к исследованию структуры и функции ферментов является метод химической модификации. Практически единственным известным реагентом, позволяющим селективно модифицировать ϵ -NH₂-группу лизина в нативной молекуле белка, является пиридоксаль-Р [1]. В последнее время он нашел широкое применение для модификации ϵ -NH₂-групп остатков лизина, находящихся в зоне активного центра ферментов, катализирующих те или иные превращения производных фосфорной кислоты [2—5]. Интерес к пиридоксаль-Р как к модифицирующему агенту обусловлен еще и тем, что в спектрах поглощения производных витамина B₆, к которым относится пиридоксаль-Р, присутствуют полосы поглощения в области 300—450 нм, не перекрывающиеся с областью поглощения хромофоров самого белка [6]. Спектральные свойства этих соединений хорошо изучены в модельных системах, что дает возможность использовать их в качестве репортерных групп [7].

Однако причины избирательности реакции пиридоксаль-Р с ϵ -NH₂-группами остатков лизина, локализованными в области активного центра ферментов, к настоящему времени не ясны. Специфичность модификации белков пиридоксаль-Р при нейтральных значениях pH может определяться двумя основными факторами: наличием ионизированной фосфатной группы

* Сокращения: пиридоксаль-Р — пиридоксаль-5'-фосфат; пиридоксаль-Sm — 5'-дезоксипиридоксаль-Р (I), пиридоксаль-S — пиридоксаль-5'-сульфат (II), пиридоксаль-Et-P — 5'-дезоксипиридоксаль-Р-этилфосфоэстер (III), РНКазы А — рибонуклеаза А, РНКазы S — рибонуклеаза S с расщепленной субтилизинной связью между 20 и 21 аминокислотными остатками, S-пептид — пептид 1—20 в первичной структуре рибонуклеазы А, S-белок — рибонуклеаза А без S-пептида, РНКазы Р — рибонуклеаза А без четырех С-концевых аминокислотных остатков (121—124), отщепленных пепсином, Р-Рху — фосфопиридоксаль-Р остаток.

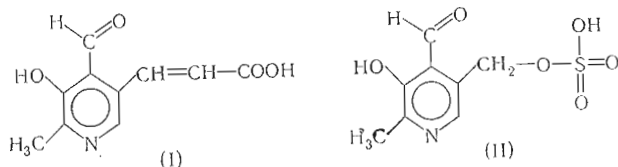
в 5'-положении пиридоксаль-Р и расстоянием между фосфатсвязывающим центром белка и модифицируемой ϵ -NH₂-группой.

По-видимому, механизм селективности может быть понят, если будет проведено детальное исследование взаимодействия пиридоксаль-Р и его аналогов с ферментами с использованием как данных о характере этой реакции в модельных системах, так и данных о характере модифицируемых групп фермента.

Целью настоящей работы является изучение роли отдельных факторов, определяющих специфичность взаимодействия пиридоксаль-Р с РНКазой А в области нейтральных значений рН, когда модификации подвергаются находящиеся в зоне активного центра ϵ -аминогруппы Lys-7 и Lys-41 [8, 9].

При изучении строения фосфопиридоксил-РНКазы А, модифицированной по ϵ -NH₂-группам Lys-7 или Lys-41, было показано, что в обоих случаях остаток фосфата локализован в активном центре фермента вблизи имидазольных циклов His-12 и His-119 [7]. Этот результат, а также тот факт, что образование альдиминного комплекса ингибируется фосфатом [8] и цитидин-2'(3')-фосфатом [9], позволяют предположить, что первой стадией процесса модификации является фиксация фосфатного остатка пиридоксаль-Р в катионном участке активного центра РНКазы А. Для подтверждения сделанного вывода мы изучили спектры протонного магнитного резонанса (ПМР) комплекса РНКазы А с пиридоксаль-Р при различных значениях рН (рис. 1). Из рис. 1 видно, что комплексообразование сопровождается повышением $pK_{\text{каж}}$ His-12 и His-119 до значений pK , характерных для комплекса РНКазы А с фосфатом [10]. Следовательно, при комплексообразовании фосфатная группа пиридоксаль-Р связывается в катионном участке активного центра фермента, который согласно данным рентгеноструктурного анализа формируется за счет His-12, His-119, Lys-7 и Lys-41 [11].

Чтобы установить, является ли присутствие в молекуле пиридоксаль-Р остатка фосфата необходимым условием селективности модификации, мы исследовали взаимодействие РНКазы А с пиридоксаль-См (I) и пиридоксаль-S (II)



Как и в случае пиридоксаль-Р, взаимодействие пиридоксаль-См с РНКазой А приводит к $\approx 60\%$ инактивации фермента (рис. 2), что указывает на модификацию остатков лизинов, входящих в активный центр фермента [12]. Однако значение константы ассоциации пиридоксаль-См с активным центром РНКазы А существенно меньше соответствующего значения константы для пиридоксаль-Р и вследствие этого реакция пиридоксаль-См с РНКазой А теряет специфичность, присущую реакции, в которой участвует пиридоксаль-Р (рис. 2, 3). Аналогичные результаты были получены при исследовании взаимодействия РНКазы А с пиридоксаль-S.

Рассмотрение молекулярных моделей пиридоксаль-Р, пиридоксаль-См и пиридоксаль-S показывает, что существуют такие конформации молекулы пиридоксаль-Р, в которых фосфатная группа совмещается с карбоксильной группой пиридоксаль-См и сульфогруппой пиридоксаль-S. Следовательно, основным фактором, нарушающим специфичность действия изученных аналогов, является замена двухзаряженного остатка фосфата на монозаряженные карбоксильную или сульфогруппу. Полученные результаты согласуются с данными ПМР, из которых следует, что ион ацетата обладает низкой специфичностью к активному центру РНКазы А [13], а ион сульфата связывается неидентично иону фосфата [10].

На основании представленных экспериментальных данных можно полагать, что специфичность взаимодействия пиридоксаль-Р с ϵ -NH₂-группами остатков лизинов РНКазы А определяется фиксированием дианиона фосфата реагента в фосфатсвязывающем участке активного центра фермента.

Ранее для фосфопиридоксильных производных РНКазы А по ϵ -NH₂-группам Lys-7 и Lys-41 было показано, что помимо взаимодействия остатка фосфата с His-12 и His-119 осуществляется также электростатическое взаимодействие фенольного гидроксила пиридоксил-Р с гуанидиниевой группой Arg-39 [12]. По-видимому, такое же взаимодействие осуществляется и в комплексе РНКазы А с пиридоксаль-Р, фиксированном в активном центре фермента.

Таким образом, первая стадия реакции, приводящая к специфической мо-

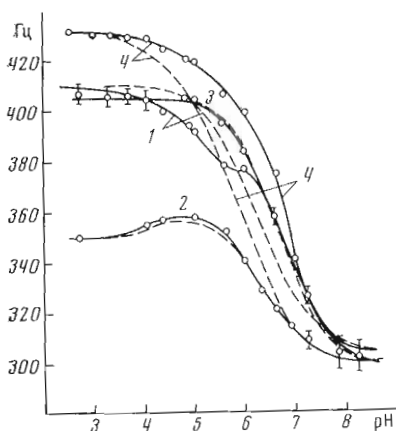


Рис. 1

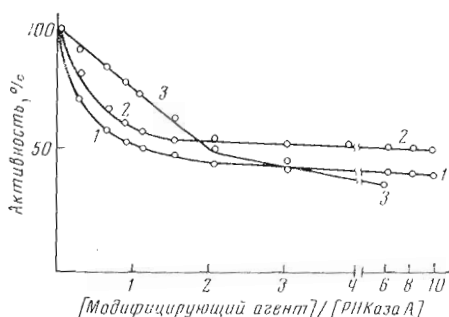


Рис. 2

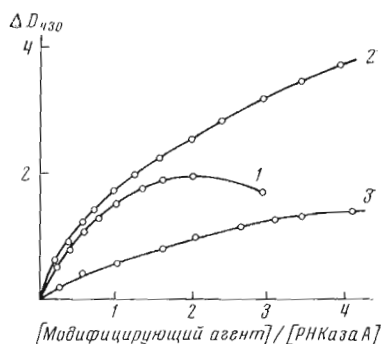


Рис. 3

Рис. 1. Кривые титрования остатков гистидинов РНКазы А (штриховые) ($5 \cdot 10^{-3}$ М) и ее комплекса с пиридоксаль-Р (сплошные), соотношение 1 : 3 : 1 — кривая титрования His-119, 2 — His-48, 3 — His-105 и 4 — His-12. На координатных осях отложены величина химического сдвига C2-H имидазольного цикла гистидина, выраженная в герцах относительно сигнала HOD, и величина рН, измеренная без поправки на изотопный эффект. $pK_{\text{как}}$ остатков гистидинов в комплексе РНКазы А — пиридоксаль-Р равны (в скобках приведены $pK_{\text{как}}$ для свободной РНКазы А): His-12 — 6,7(6,0), His-48 — 6,4(6,4), His-105 — 6,7(6,7), His-119 — 6,95(6,3). Измерения проводили в растворе 0,2 М NaCl

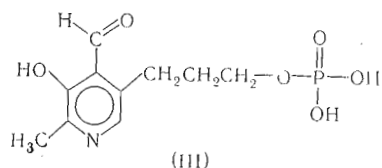
Рис. 2. Инактивация РНКазы А пиридоксаль-Р (1), пиридоксаль-Et-Р (2) и пиридоксаль-St (3). РНКазу А ($0,75 \cdot 10^{-3}$ М) в 0,05 М натрий — ацетатном буфере (рН 5,5) инкубировали 15 мин при 20° в присутствии пиридоксаль-Р и его аналогов в различных концентрациях. Ферментативную активность определяли после восстановления продуктов реакции NaBH_4 [9]

Рис. 3. Спектрометрическое титрование РНКазы А пиридоксаль-Р (1), пиридоксаль-Et-Р (2), пиридоксаль-St (3). На оси ординат отложена величина амплитуды разностного спектра поглощения при 430 нм, возникающего при комплексообразовании. Концентрация РНКазы А $0,75 \cdot 10^{-3}$ М. Комплексообразование проводили в 0,05 М натрий-ацетатном буфере (рН 5,5) при 20°. Запись спектров проводили через 15 мин после смещения компонентов

дификации ϵ -NH₂-групп Lys-7 и Lys-41, заключается в образовании комплекса пиридоксаль-Р — РНКазы А аналогично тому, как при взаимодействии субстрата с ферментом образуется комплекс Михаэлиса. В результате пиридоксаль-Р за счет многоточечного связывания фиксируется в ак-

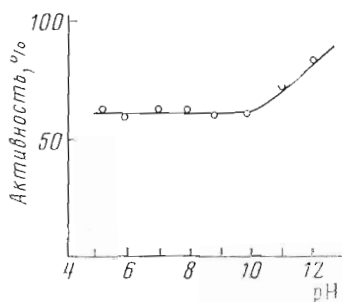
тивном центре фермента и создается вынужденное сближение $\epsilon\text{-NH}_2$ -группы белка и альдегидной группы реагента, приводящее также к стабилизации продукта реакции — альдиминного комплекса. Сделанный вывод хорошо согласуется с экспериментальными данными, полученными ранее. При исследовании взаимодействия пиридоксаль-Р с РНКазой А методом равновесной гель-фильтрации было показано, что при pH 5,5 константа диссоциации комплекса, определенная по изменению оптической плотности при 388 нм (полоса поглощения пиридоксаль-Р), составляет $\approx 2 \cdot 10^{-5}$ М [9].

Для того чтобы выяснить, какую роль при специфической модификации РНКазы А играет расстояние между фосфатной и альдегидной группами реагента, мы изучили взаимодействие РНКазы А с пиридоксаль-Et-Р (III).



Так же как пиридоксаль-Р, пиридоксаль-Et-Р вызывает $\approx 60\%$ инактивацию фермента (рис. 2), однако в отличие от пиридоксаль-Sm, максимальная инактивация наблюдается при соотношении реагента с РНКазой А 1 : 1. При дальнейшем увеличении концентрации пиридоксаль-Et-Р, как и в случае пиридоксаль-Р и пиридоксаль-Sm, наблюдается неспецифическая модификация фермента, не приводящая к существенному уменьшению его активности (рис. 2, 3). Аналогично комплексу РНКазы А с пиридоксаль-Р [8] комплекс фермента с пиридоксаль-Et-Р существует при pH 5—9, причем в этом интервале значений pH его структура, по-видимому, сохраняется, на что указывает постоянная величина степени инактивации РНКазы А (рис. 4). Хроматографическое разделение эквимольной смеси РНКазы А и пиридоксаль-Et-Р, обработанной NaBH_4 (рис. 5), показывает, что процент прореагировавшего фермента сравним с таковым для реакции РНКазы А с пиридоксаль-Р ($\approx 85\%$) [9]. Около 60% продуктов реакции (рис. 5, пики 1—5) обладают каталитической активностью от 50 до 70%.

Рис. 4. Инактивация РНКазы А в присутствии эквимольных количеств пиридоксаль Et-Р при различных значениях pH. Реакцию проводили в растворе 0,2 М NaCl. Нужно значение pH получали, титруя реакционную смесь 0,1 М HCl или 0,1 М NaOH. Ферментативную активность измеряли после восстановления NaBH_4 [19]



Фракция модифицированного фермента, соответствующая пику 6, полностью неактивна и составляет 25% от общего количества РНКазы А. Молярное соотношение ковалентно связанного пиридоксаль-Et-Р к РНКазе А в фракции 6 равно 1 : 1. По хроматографической подвижности, количеству молекул пиридоксаль-Et-Р, связанной с белком, и каталитической активности фракция 6 соответствует РНКазе А, модифицированной пиридоксаль-Р по $\epsilon\text{-NH}_2$ -группе Lys-41 [9]. При гидролизе модифицированной РНКазы А из фракции 6 субтилизином был получен белок — производное РНКазы S, который при хроматографии на сефадексе G-75 в 5%-ной муравьиной кислоте делится на S-белок, содержащий хромофорную метку, и немеченный S-пептид. Предположение о том, что фракция 6 содержит РНКазу А, модифицированную по Lys-41, подтверждается также тем фак-

том, что образование этого продукта полностью ингибируется 2' (3')-СМР при соотношении фермент — ингибитор 1 : 10.

Таким образом, введение дополнительного $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ звена в 5'-положение пиридоксаль-Р практически не сказывается на специфичности реакции.

Рассмотрение молекулярных моделей пиридоксаль-Р и пиридоксаль-Et-Р показало, что существуют конформации, в которых фосфатная и альдегидная группы обоих соединений могут быть совмещены. Следовательно, полученные результаты указывают на то, что специфичность модификации аминогрупп пиридоксаль-Р определяется расстоянием между фосфатным остатком реагента, связанным в катионном центре фермента, и модифицируемой группой, а не расстоянием между фосфатом и альдегидной группой пиридоксаль-Р.

Для того чтобы определить, какое расстояние между фиксированным остатком фосфата в комплексе ингибитор — белок и модифицируемой аминогруппой лизина является оптимальным для реакции, мы изучили взаимодействие пиридоксаль-Р с РНКазой S. В работе Карлайла и соавт. [14] было показано, что расстояние между центрами фосфата, связанного в активном центре фермента, и ϵ - NH_2 -группы Lys-7 в РНКазе S и РНКазе A существенно отличаются. В РНКазе S оно составляет $\approx 8 \text{ \AA}$, а в РНКазе A — около 5 \AA . При этом расстояние ϵ - NH_2 -группы Lys-41 от фосфатсвязывающего центра в обоих белках одинаково и составляет $\approx 7 \text{ \AA}$. Кроме того, из данных, полученных при исследовании взаимодействия РНКазы A и РНКазы S с фосфат-ионом методом ПМР было показано, что фосфат в активном центре РНКазы A и РНКазы S связывается одинаково [10]. По-видимому, при реакции РНКазы S с пиридоксаль-Р, так же как и в случае РНКазы A [9], модифицируется ϵ - NH_2 -группа Lys-7 и Lys-41 (рис. 6), однако соотношение продуктов меняется. Гетерогенный компонент 1 на рис. 6 составляет не более 10%, а компонент 2, содержащий РНКазу S, модифицированную по ϵ - NH_2 -группе Lys-7 — около 50%. В то же время фракция, содержащая фермент, модифицированный по ϵ - NH_2 -группе Lys-41 (компонент 3) составляет не более 15% от общего количества РНКазы S. Таким образом, очевидно, что пиридоксаль-Р может селективно модифицировать аминогруппы, находящиеся на расстоянии до 8 \AA от фосфатсвязывающего центра фермента. Разная степень модификации ϵ - NH_2 -группы Lys-7 и Lys-41, находящихся на практически одинаковом расстоянии от фосфатсвязывающего центра РНКазы S, указывает на то, что специфичность модификации определяется не только расстоянием. По-видимому, когда расстояние от центра связывания фосфата составляет менее 8 \AA , селективность модификации зависит от стабильности продуктов реакции, определяемой локальным белковым окружением.

Интересным следствием из полученных результатов является то, что пиридоксаль-Р и его производные можно использовать как инструмент для определения расстояний между функциональными группами активного центра ферментов в растворе и характеристики микроокружения модифицирующихся аминогрупп. В качестве примера мы изучили взаимодействие пиридоксаль-Р с РНКазой Р и S-белком. Ранее было показано, что отщепление С-концевого тетрапептида приводит к резкому снижению ферментативной активности РНКазы A [15] и к значительному повышению величины $r_{K_{\text{каж}}}$ His-12 и His-119 [16]. В то же время РНКазы Р образует специфический комплекс с 3'-СМР, причем остаток фосфата нуклеотида в активном центре РНКазы Р связывается аналогично тому, как он связан в комплексе 3'-СМР с РНКазой А [16]. Изучение хроматографического профиля продуктов реакции РНКазы Р с пиридоксаль-Р, восстановленных NaBH_4 (рис. 7), показывает, что белок модифицируется неспецифично. Следовательно, изменилось взаиморасположение имидазольных циклов His-12, His-119 и аминогрупп Lys-7 и Lys-41. Так как реакционная способность (по крайней мере, остатка Lys-41) при отщеплении С-концевого тетрапептида

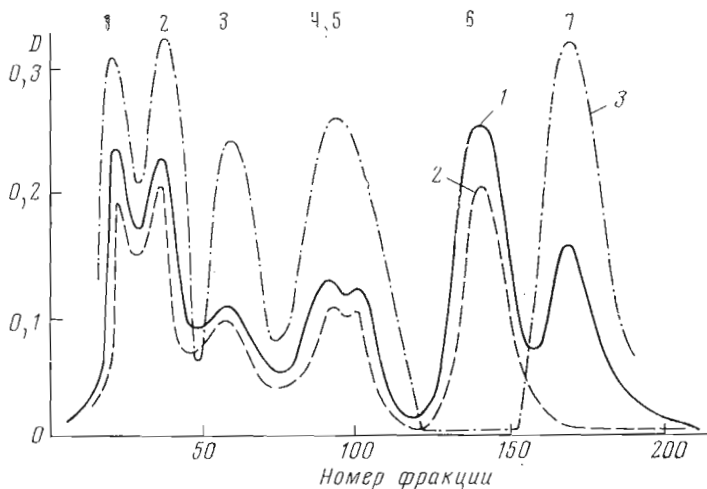


Рис. 5. Хроматографическое разделение продуктов, полученных при восстановлении NaBH_4 эквимольной смеси РНКазы А и пиридоксаль-Ет-Р. Колонка с SP-сефадексом С-25 (2.60 см), элюция со скоростью 30 мл/ч, фракции по 7 мл. 1 и 2 — поглощение фракций соответственно при 280 и 330 нм, 3 — относительная активность фракций

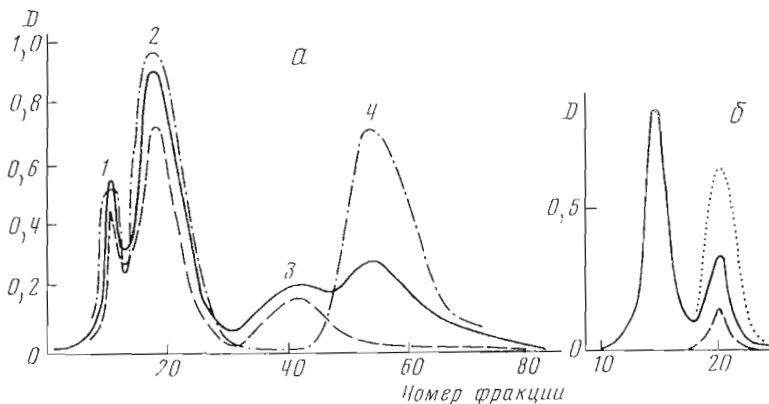


Рис. 6. Хроматографическое разделение продуктов, полученных при восстановлении NaBH_4 эквимольной смеси РНКазы S и пиридоксаль-Р (а) и гель-фильтрация фракций 13—25 на колонке (1.75 см) с сефадексом G-75 (б). а: колонка (1.45 см) с SP-сефадексом С-25, скорость элюции 7 мл/ч, фракции по 1,6 мл. б: элюция 5%-ной муравьиной кислотой со скоростью 5 мл/ч, фракции по 1 мл. Пунктирная кривая — абсорбция фракций при 570 нм после окрашивания аликвот (0,25 мл) вингидрином. Обозначения те же, что и на рис. 5

не меняется [15], то можно сделать вывод, что отмеченное нами ранее повышение $pK_{\text{каж}}$ His-12 и His-119 при превращении РНКазы А в РНКазу Р происходит за счет изменения расстояний между фосфатсвязывающим центром и $\epsilon\text{-NH}_2$ -группами Lys-7 и Lys-41. Такая дезорганизация активного центра может вызвать и потерю каталитической активности.

При хроматографическом разделении продуктов восстановления комплекса S-белка с пиридоксаль-Р было выявлено три основных пика (рис. 8). Фракция 3 на рис. 8 соответствует свободному S-белку, а фракция 2, образующаяся со значительным выходом, — производному по $\epsilon\text{-NH}_2$ -группе Lys-41. Этот вывод базируется на том, что подвижность белка из фракции 2 при хроматографии на SP-сефадексе С-25 и амберлите IRC-50, а также его спектральные свойства идентичны соответствующим параметрам (P-Pxy)- ϵ -Lys-41-S-белка, полученного из (P-Pxy)- ϵ -Lys-41-РНКазы S. Таким об-

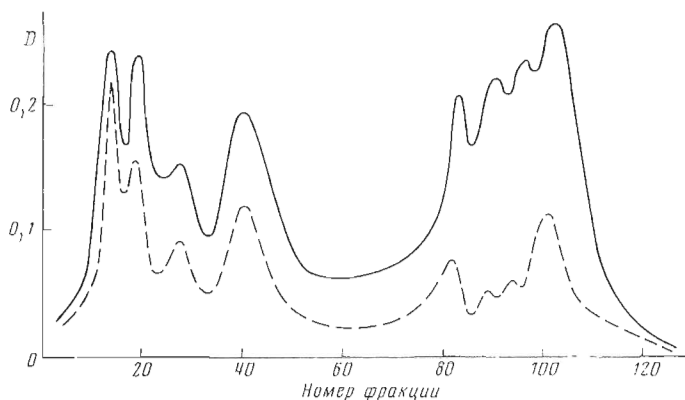


Рис. 7. Хроматографическое разделение продуктов, полученных при восстановлении NaBH_4 эквимольной смеси РНКазы Р и пиридоксаль-Р. Колонка (1,45 см) с SP-сефадексом С-25. Скорость элюции 7 мл/ч, фракции по 1,6 мл. Обозначения те же, что на рис. 5

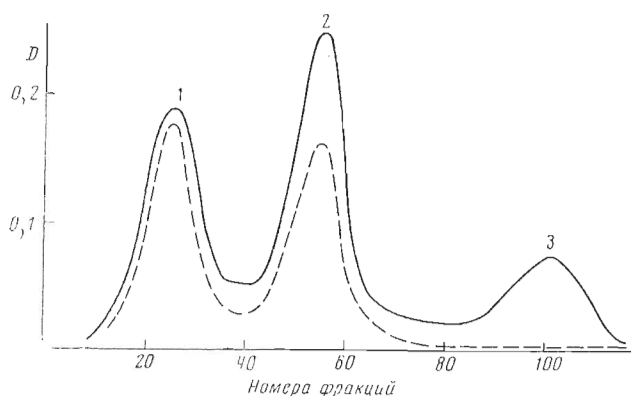
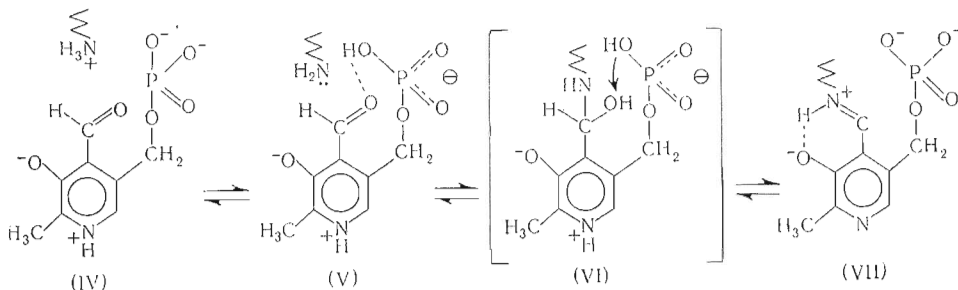


Рис. 8. Хроматографическое разделение продуктов, полученных при восстановлении NaBH_4 эквимольной смеси пиридоксаль-Р и S-белка. Колонка (3,5·30 см) с SP-сефадексом С-25. Скорость элюции 10 мл/ч, фракции по 3,5 мл. Обозначения те же, что на рис. 5

разом, очевидно, что расстояние между $\epsilon\text{-NH}_2$ -группой Lis-41 и остатком His-119, а также локальное окружение остатка Lys-41 в S-белке мало отличаются от соответствующих параметров активного центра РНКазы А и РНКазы S. Возможно, этим объясняется тот факт, что S-белок сохраняет способность катализировать синтез динуклеозидфосфатов из соответствующих нуклеозидов и 2',3'-циклофосфатов нуклеозидов [17].

На основании результатов, полученных при изучении взаимодействия РНКазы А с пиридоксаль-Р и его аналогами по 5'-положению, механизм модификации $\epsilon\text{-NH}_2$ -групп остатков лизинов в активном центре РНКазы А может быть представлен в следующем виде:



Связывание пиридоксаль-Р в активном центре РНКазы А обусловлено присутствием в его молекуле отрицательно заряженного остатка фосфорной кислоты, специфически взаимодействующего с фосфатсвязывающим участком активного центра. Образовавшийся комплекс фиксируется в определенном положении многоточечными контактами между остальной частью молекулы пиридоксаль-Р и группами белка. Следствием этого является вынужденное сближение реагирующей ϵ -аминогруппы лизина, альдегидной и фосфатной групп пиридоксаль-Р (IV). В результате пространственной сближенности реагирующих групп возникает возможность переноса протона в комплексе от ϵ - NH_3^+ -группы лизина к фосфорильному кислороду пиридоксаль-Р (V) с непосредственно следующим за этим присоединением нуклеофильной ϵ - NH_2 -группы к активированной карбонильной группе (VI). Таким образом, пиридоксаль-Р способен при взаимодействии с РНКазой А давать нековалентный комплекс, подобный комплексу Михаэлиса с субстратом, что делает возможным образование альдиминной связи при pH 5—6, когда доля непротонированных аминогрупп РНКазы А очень мала (рК ϵ - NH_2 -групп лизинов РНКазы А составляет 8—9 [18]). Преимущественная модификация аминогрупп, находящихся на расстоянии 5—8 Å от фосфатсвязывающего центра, определяется стабильностью образующегося в этом случае продукта реакции (VII), обусловленной высоким средством пиридоксаль-Р к активному центру фермента [9]. Анализ результатов, полученных при модификации РНКазы А и РНКазы S показывает, что одним из основных факторов, обуславливающих разную стабилизацию альдиминного комплекса с Lys-7 и Lys-41, могут быть отличия в подвижности модифицируемых аминогрупп фермента, находящихся в различном локальном окружении. Можно полагать, что преимущественно модифицируется аминогруппа, обладающая большей подвижностью, так как при этом продукт реакции имеет возможность принимать конформацию, в которой обеспечивается его максимальная стабильность. Экспериментальные результаты хорошо согласуются с данными рентгеноструктурного анализа РНКазы S [11], из которых следует, что в отличие от Lys-7 остаток Lys-41 погружен в белковую глобулу и не обладает конформационной подвижностью.

Приведенная схема реакции, по-видимому, может быть общей для ферментов, субстратами которых являются производные фосфорной кислоты.

Экспериментальная часть

РНКазу А и РНКазу S получали аналогично работе [9], РНКазу Р — аналогично работе [16]. Аналоги пиридоксаль-Р были любезно предоставлены В. Л. Флорентьевым и Р. М. Хомутовым. Все использованные в работе реагенты были химически чистыми и все растворы готовились на деионизованной бидистиллированной воде.

Модификацию белков пиридоксаль-Р и его аналогами проводили по методу, описанному ранее [9]. Для разделения модифицированных ферментов использовали хроматографию на SP-сефадексе С-25, уравновешенном натрий-фосфатным буфером при pH 6,5. Разделение модифицированных препаратов РНКазы А проводили в 0,07 М фосфатном буфере, модифицированных препаратов РНКазы S — в 0,075 М фосфатном буфере, производных РНКазы Р — в градиенте фосфатного буфера 0,1—0,2 М и производных S-белка — в градиенте фосфатного буфера 0,1—0,13 М.

Концентрацию белков и модифицирующих агентов определяли спектрофотометрически. Для определения концентрации белков использовали коэффициенты молярной экстинкции, приведенные в работах, описывающих получение соответствующего фермента. Для модифицирующих агентов использовали следующие коэффициенты молярной экстинкции при pH 7,0, $\text{м}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$: пиридоксаль-Р — ϵ_{388} 4900 [19], пиридоксаль-Сm — ϵ_{393} 7200 [20], пиридоксаль-Et-Р — ϵ_{320} 4200 [20], пиридоксаль-S — ϵ_{330} 1730 [21]. Фер-

ментативную активность определяли, используя в качестве субстрата РНК, как это описано в работе [9].

Спектры ПМР снимали аналогично описанному в работе [7], спектры поглощения снимали на спектрофотометрах «Unicam SP-500» (Англия) и «Specord UV — Vis» (ГДР) при 20°.

Авторы благодарны В. Г. Сахаровскому за помощь при снятии спектров ПМР.

ЛИТЕРАТУРА

1. Vallee B. L., Riordan J. F. (1969) *Annual Rev. Biochem.*, **38**, 733—794.
2. Johnson, G. S., Deal W. C. (1970) *J. Biol. Chem.*, **245**, 238.
3. Davis L. C., Brox Z. W., Gracy R. W., Ribereau-Gayon G., Horecker B. L. (1970) *Arch. Biochem. and Biophys.*, **140**, 215—222.
4. Schnackerz K. D., Holtmann F. A. (1971) *Biochemistry*, **10**, 4837—4843.
5. Greenwell P., Jewett S. L., Stark G. R. (1973) *J. Biol. Chem.*, **248**, 5994—6001.
6. Морозов Ю. В., Бажулина Н. И., Карпейский М. Я. (1968) *Химия и биология пиродоксалевого катализа*, стр. 37—45, «Наука», М.
7. Карпейский М. Я., Дудкин С. М., Сахаровский В. Г., Шляпников С. В. (1974) *Структура и функции активных центров ферментов*, стр. 183—203, «Наука», М.
8. Raetz C. R. H., Auld D. S. (1972) *Biochemistry*, **11**, 2229—2236.
9. Борисова С. Н., Матросов В. И., Шляпников С. В., Карпейский М. Я. (1974) *Молекулярная биология*, **8**, 286—295.
10. Cohen J. S., Griffin J. H., Schechter A. N. (1973) *J. Biol. Chem.*, **248**, 4305—4310.
11. Wyckoff H. W., Tsernoglou D., Hanson A. W., Knox J. R., Lee B., Richards F. M. (1970) *J. Biol. Chem.*, **245**, 305—328.
12. Dudkin S. M., Karabachyan L. V., Borisova S. N., Shlyapnikov S. V., Karpeisky M. Ya., Geidarov T. G. (1975) *Biochim. et biophys. acta*, **386**, 275—282.
13. Roberts G. C. K., Meadows D. H., Jardetzky O. (1969) *Biochemistry*, **8**, 2053—2056.
14. Carlisle C. H., Palmer R. A., Mazumbar S. K., Gorinsky B. A., Yeates D. G. R. (1974) *J. Mol. Biol.*, **85**, 1—18.
15. Lin M. C. (1970) *J. Biol. Chem.*, **245**, 6726—6731.
16. Sacharovskiy V. G., Chervin I. I., Yakovlev G. I., Dudkin S. M., Karpeisky M. Ya., Shlyapnikov S. V. (1973) *FEBS Lett.*, **33**, 323—326.
17. Bernfield M. R. (1965) *J. Biol. Chem.*, **240**, 4753—4762.
18. Goldfarb A. R., Buchanan D. N., Sutton D. E. (1974) *Bioorganic Chemistry*, **3**, 260—266.
19. Peterson E. A., Sober H. A. (1954) *J. Amer. Chem. Soc.*, **76**, 169—175.
20. Колобушкина Л. И., Спиридонова Н. И., Флорентьев В. Л. (1974) *Химия гетероциклических соединений*, № 5, 655—660.
21. Kuroda H. (1963) *Vitamins (Kyoto)*, **28**, 21—31.

Поступила в редакцию
6.V.1975

MODIFICATION OF RIBONUCLEASE A BY PYRIDOXAL 5'-PHOSPHATE AND ITS ANALOGES

BORISOVA S. N., DUDKIN S. M., SHLYAPNIKOV S. V., AVRAMOVA Z. V.,
KARPEISKY M. Ya.

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

Modification of ribonuclease A, ribonuclease S, des-(121-124)-ribonuclease A and des-(1-20)-ribonuclease A by pyridoxal-P as well as modification of ribonuclease A by 5'-deoxy, 5'-carboxymethylenepyridoxal, pyridoxal-5'-sulfate and 5'-deoxy-5'-ethylphosphopyridoxal were studied. The selectivity in modification of lysine amino groups by pyridoxal-P was found to be determined by three main factors: 1. the existence of the phosphate residue in the 5'-position of the pyridoxal-P; 2. the distance between pyridoxal-P phosphate binding site in the enzyme active center and the amino group to be modified; 3. the stability of the reaction products which is dependent on the local protein environment. The possible mechanism of the active center lysines modification by pyridoxal-P was proposed.