



УДК 577.155 ; 543.422.8

**РЕНТГЕНОСТРУКТУРНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ РИБОНУКЛЕАЗЫ S,  
МОДИФИЦИРОВАННОЙ ПИРИДОКСАЛЬ-5'-ФОСФАТОМ\*****Борисова С. Н., Павловский А. Г., Борисов В. В.,  
Карпейский М. Я., Вайнштейн Б. К., Сосфенов Н. И.***Институт кристаллографии Академии наук СССР**Институт молекулярной биологии Академии наук СССР,  
Москва*

Получены кристаллы изомеров модифицированной пиридоксаль-Р РНКазы S: (P-Pxy)-ε-Lys-7-РНКазы S и (P-Pxy)-ε-Lys-41-РНКазы S. Проведено рентгеноструктурное исследование кристаллов модифицированной РНКазы S с разрешением 5 Å, в результате которого удалось локализовать положение фосфопиридоксильного остатка в молекуле РНКазы S. Показано, что при алкилировании пиридоксаль-Рε-аминогруппы Lys-41 возникают стерические препятствия специфическому связыванию нуклеотида РНКазой S.

Изучению структуры и функции РНКазы в кристалле и в растворе посвящено значительное число работ [1—3]. Большое внимание было уделено функциональной топографии активного центра РНКазы, роли и электронному состоянию групп, входящих в его состав; Lys-41, Lys-7, His-12, His-119, Phe-120, Thr-45. Важное значение для понимания механизма связывания и превращения субстратов имеет взаиморасположение заряженных групп и в особенности ε-аминогруппы Lys-41. Используя метод химической модификации и данные рентгеноструктурного анализа кристаллов РНКазы S, модифицированной ДНФ по ε-аминогруппе Lys-41, было проведено изучение роли этой группы в функционировании фермента [2]. Модифицированный фермент — ε-ДНФ-Lys-41-РНКазы S — в кристаллическом состоянии способен специфически связывать нуклеотид аналогично тому, как это происходит для немодифицированной РНКазы S, но лишен каталитической активности. Причиной потери каталитической активности РНКазой S, по мнению авторов, является смещение ε-аминогруппы Lys-41 в результате модификации на 3 Å в сторону от каталитического участка активного центра, включающего имидазольные кольца His-12 и His-119 [2].

Недавно было показано, что введение в молекулу РНКазы A фосфопиридоксильного остатка (селективным алкилированием с помощью пиридоксаль-Р ε-аминогруппы 7-го или 41-го остатков лизина) оказывает заметное влияние на свойства His-12 и His-119 [3]. При этом относительная активность РНКазы A, модифицированной по 7-му остатку лизина, умень-

\* Сокращения: РНКазы S — каталитически активное производное РНКазы A, полученное при расщеплении субтилизинной пептидной связи между 20 и 21 аминокислотными остатками; (P-Pxy)-ε-Lys-7(41)-РНКазы A(S)—РНКазы A(S), замещенная по ε-аминогруппе 7(41)-го лизина фосфопиридоксильным остатком; пиридоксаль-Р — пиридоксаль-5'-фосфат; пиридоксамин-Р — пиридоксамин-5'-фосфат; 3'-СМР — цитидин-3'-фосфат; ДНФ — динитрофторбензол.

шается примерно в 2 раза, а  $K_m$  практически не изменяется. Алкилирование 41-го остатка лизина вызывает не только инактивацию фермента, но и потерю способности к специфическому связыванию нуклеотидов. Нам представлялось интересным определить положение фосфопиридоксильного остатка в третичной структуре модифицированной РНКазы S и на этой основе объяснить свойства модифицированных белков. С этой целью были получены индивидуальные препараты РНКазы S, модифицированной по 41-му или 7-му остаткам лизина, и проведено рентгеноструктурное исследование кристаллов (P-Pxy)- $\epsilon$ -Lys-7-РНКазы S, (P-Pxy)- $\epsilon$ -Lys-41-РНКазы S и комплекса (P-Pxy)- $\epsilon$ -Lys-7-РНКазы S с 3'-CMP с разрешением 5 Å.

Мы использовали метод разностных синтезов электронной плотности, который в настоящее время широко применяется при изучении строения комплексов ферментов с лигандами [4]. Следует отметить, что этот метод может быть применен только в тех случаях, когда уже известна атомная структура нативного фермента и кристаллы комплекса изоморфны кристаллам белка. Метод разностных синтезов не только обеспечивает высокую точность (по сравнению с обычным синтезом электронной плотности), дает возможность непосредственно видеть молекулу лиганда в трехмерной структуре фермента, но и позволяет регистрировать смещение различных групп белка (сместившаяся группа проявляется в виде пары положительного и отрицательного максимумов на картах разностного синтеза электронной плотности). Таким образом, метод позволяет судить об изменениях конформационного состояния молекулы фермента при образовании комплекса.

На рис. 1, а изображена область активного центра молекулы РНКазы S, построенная по координатам, приведенным Вайкофом и соавт. [5], и облако положительной электронной плотности, полученной из разностных синтезов для (P-Pxy)- $\epsilon$ -Lys-7-РНКазы S. Облако электронной плотности состоит из двух перекрывающихся эллипсоидов, больший из которых (соответствующий пиридиновому циклу остатка пиридоксамин-Р) примыкает к концу боковой группы Lys-7 и простирается в сторону His-119, а меньший — располагается в районе His-119 и частично соответствует фосфатной группе модифицирующего агента.

На рис. 2 изображены сечения разностного синтеза электронной плотности (P-Pxy)- $\epsilon$ -Lys-41-РНКазы S. Область положительной электронной плотности, соответствующая пиридоксамин-Р, заходит глубже в щель активного центра РНКазы S, чем соответствующая область в (P-Pxy)- $\epsilon$ -Lys-7-РНКазе S, и состоит из двух почти не пересекающихся дисков, перпендикулярных тройной оси (рис. 1, б). Больший по размеру диск примыкает к  $\epsilon$ -аминогруппе Lys-41, меньший — располагается между боковыми группами His-12 и His-119 в месте, которое в немодифицированном ферменте является фосфатсвязывающим центром [1]. Присутствие положительного и отрицательного пиков в районе боковой группы Lys-41 указывает на смещение этой группы на 1—2 Å в сторону активного центра по сравнению с ее положением в нативном ферменте.

Большая часть электронной плотности (соответствующая пиридиновому циклу) на разностном синтезе (P-Pxy)- $\epsilon$ -Lys-41-РНКазы S имеет максимальное абсолютное значение, в 2,5 раза выше соответствующей величины на разностном синтезе (P-Pxy)- $\epsilon$ -Lys-7-РНКазы S. Значения положительной электронной плотности в районе His-119 на обоих синтезах примерно одинаковы и немного меньше величины электронной плотности, соответствующей пиридиновому циклу на синтезе РНКазы S, модифицированной по 7-му остатку лизина.

Для выяснения различий в способности к специфическому связыванию нуклеотидов двух изомеров модифицированной РНКазы необходимо было определить расположение нуклеотида в молекуле РНКазы при комплексобразовании. Методом ЯМР-спектроскопии было показано, что характер связывания РНКазой A (S) нуклеотида в растворе сохраняется для (P-

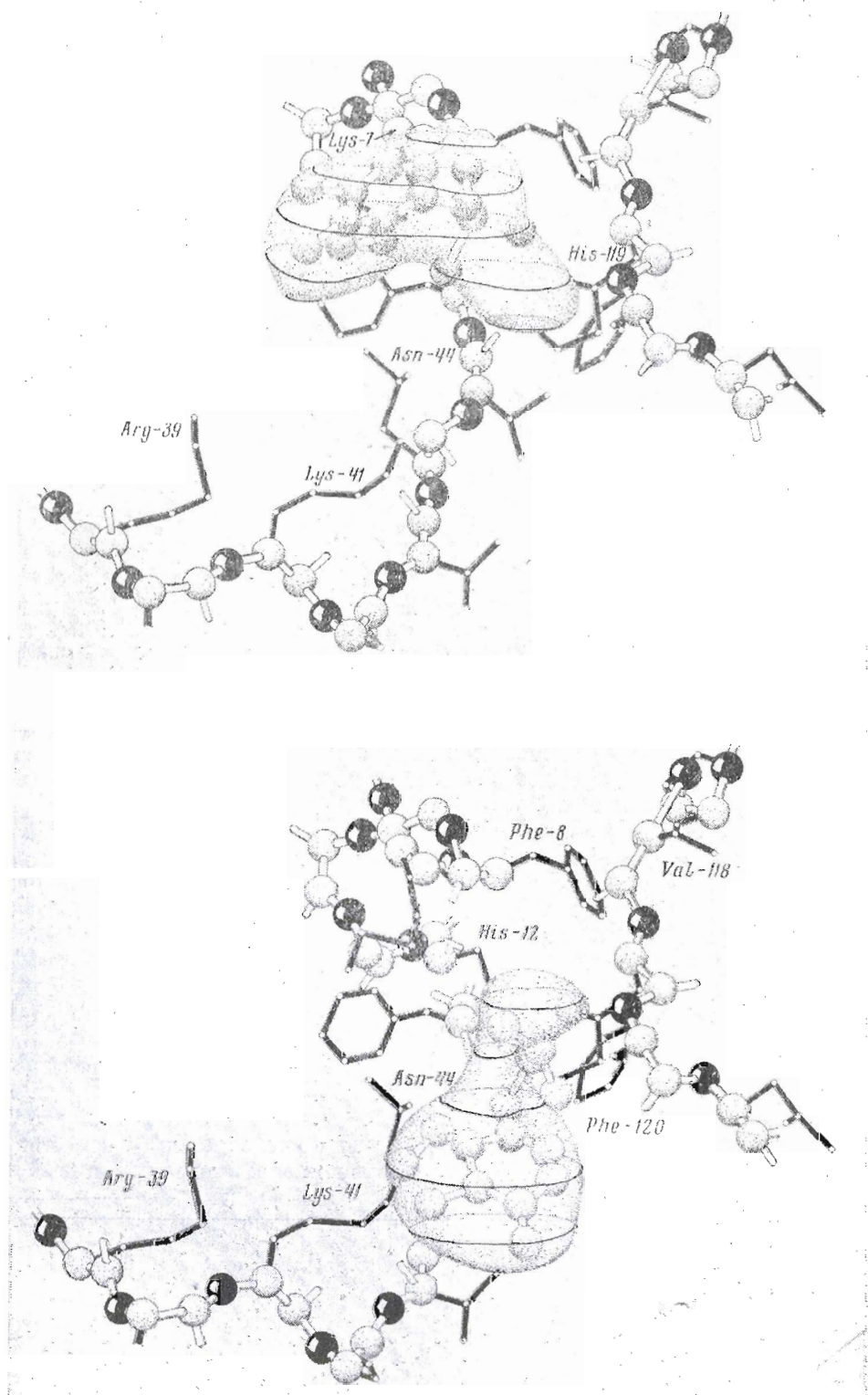


Рис. 1. Область активного центра РНКазы S с наложением на нее изображения «облака» электронной плотности, соответствующей остатку пиридоксамин-Р, примерная конформация которого указана: а — для (P-Pxy)-ε-Lys-7-РНКазы S, б — для (P-Pxy)-ε-Lys-41-РНКазы S

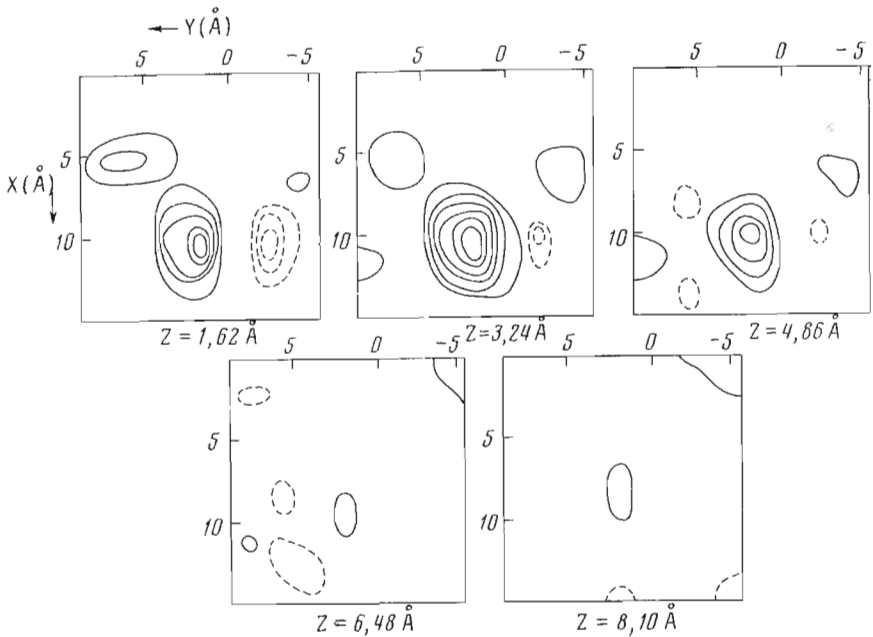


Рис. 2. Сечения разностного синтеза электронной плотности (P-Pxy)-ε-Lys-41-РНКазы S. Сплошная линия соответствует уровням положительной электронной плотности, пунктирная — отрицательным. Изолинии проведены с интервалом, равным 1/7 максимального значения электронной плотности. Нулевой уровень отсутствует

Рху)-ε-Lys-7-РНКазы A (S) [3], следовательно, можно было ожидать, что при рентгеноструктурном исследовании комплекса модифицированной РНКазы S и нуклеотида будет обнаружено смещение фосфошироксильного остатка из зоны активного центра.

Главной особенностью разностного синтеза электронной плотности комплекса (P-Pxy)-ε-Lys-7-РНКазы S с 3'-СМР (рис. 3) является наличие сильного максимума электронной плотности в глубине зоны активного центра — между боковыми группами Phe-120, Thr-45 и His-12. Величина этого максимума в 2 раза превышает максимальное значение электронной плотности на разностном синтезе РНКазы S, модифицированной по Lys-41, и в 5 раз — на синтезе РНКазы S, модифицированной по Lys-7. Облако положительной электронной плотности доходит до His-119 и протягивается еще дальше, выходя на поверхность молекулы РНКазы. Непосредственно вблизи His-119 величина облака электронной плотности понижается до того же уровня, что наблюдается в этой части молекулы фермента на двух предыдущих синтезах. Общий характер распределения электронной плотности на разностном синтезе комплекса хорошо согласуется с расположением 3'-СМР, приведенном в работах по изучению комплексов РНКазы S с нуклеотидами [1, 6].

На этом же синтезе имеется область положительной электронной плотности, слегка превышающая уровень фона, в районе конца боковой группы Lys-7 и чуть большая по абсолютной величине плотность вблизи положительно заряженных боковых групп Arg-10 и Arg-39. Пара положительного и отрицательного пиков в районе боковой группы Arg-10 говорит о смещении ее по направлению к Arg-39.

При интерпретации разностного синтеза комплекса (P-Pxy)-ε-Lys-7-РНКазы S и 3'-СМР было принято, что максимальная электронная плотность соответствует пиримидиновому основанию нуклеотида. Область положительной электронной плотности в районе конца боковой группы Lys-7 и остатка Arg-39 (рис. 3) можно рассматривать как свидетельство

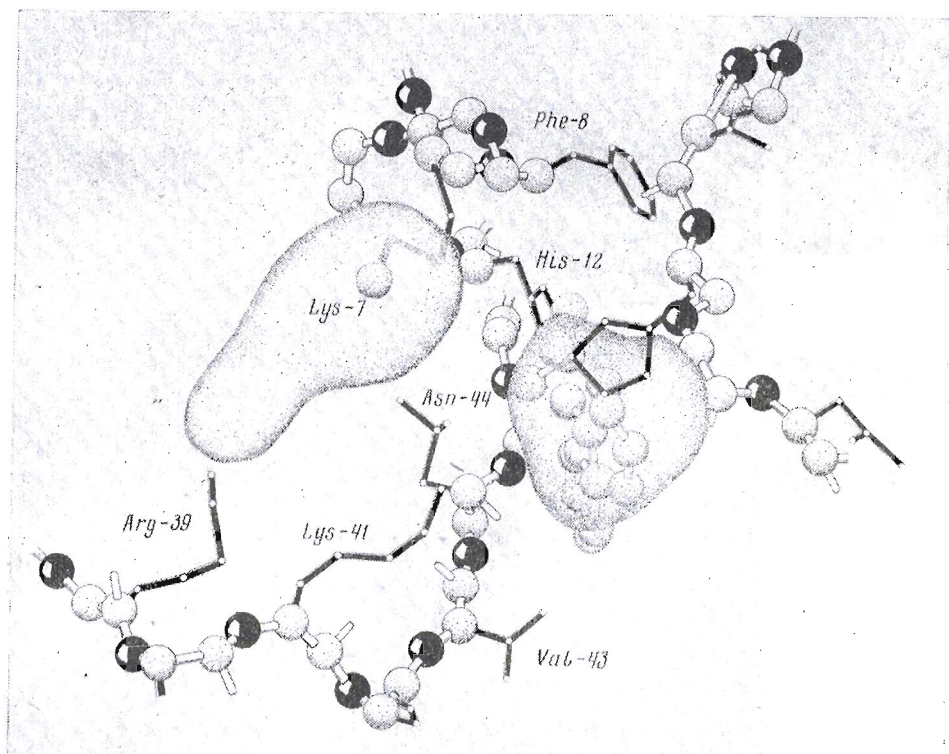


Рис. 3. Область активного центра РНКазы S с наложенным на нее изображением «облаков» электронной плотности, соответствующей фосфопиридоксильному остатку и 3'-СМР, полученных из разностного синтеза для комплекса (P-Pxy)-ε-Lys-7-РНКазы S и 3'-СМР

нового расположения фосфопиридоксильного остатка, отрицательно заряженная фосфатная группа которого в комплексе фиксируется вблизи положительно заряженных боковых групп Arg-39 и Arg-10. Небольшой сдвиг боковой группы Arg-10 является результатом электростатического взаимодействия с фосфатной группой фосфопиридоксильного остатка.

Основной особенностью всех приведенных разностных синтезов является отсутствие большой электронной плотности, соответствующей фосфатной группе. Это, однако, объясняется тем, что рентгеновские данные по РНКазе S были получены для кристаллов, в которых в фосфатсвязывающем центре (область P<sub>1</sub>) находится сульфат-анион с заполнением ~ 75% [5], поэтому мы видим в этом месте на разностных синтезах небольшую по абсолютной величине электронную плотность, соответствующую разности электронных плотностей фосфатной и сульфатной групп.

Значение электронной плотности, соответствующей пиримидиновому основанию, на разностном синтезе комплекса 3'-СМР и РНКазы S, модифицированной по ε-аминогруппе Lys-7, существенно выше величины электронной плотности пиридинового цикла на разностных синтезах изомеров модифицированной РНКазы S, несмотря на то, что электронные плотности пиримидинового основания и пиридинового цикла должны быть примерно равными при уровне разрешения 5 Å. Поиженная электронная плотность пиридинового цикла может быть связана, во-первых, с реализацией в кристалле одновременно нескольких конформаций фосфопиридоксильного остатка относительно молекулы белка; во-вторых, расположенный на поверхности молекулы фосфопиридоксильный остаток может вытеснять сульфат-анионы, частично фиксированные на молекуле белка; наконец, облучение кристаллов модифицированной РНКазы S в ходе рентгеновского

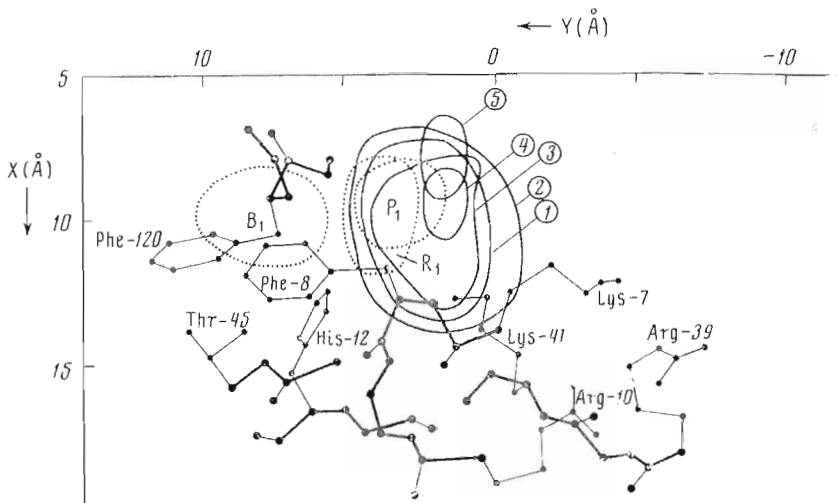


Рис. 4. Сечения разностного синтеза электронной плотности (P-Pxy)-ε-Lys-41-РНКазы S в проекции вдоль оси Z (сплошная линия), совмещенные со схематическим изображением областей B<sub>1</sub>, R<sub>1</sub>, P<sub>1</sub> (пунктирная линия) нуклеотида, связанного с РНКазой. Номера сечений: 1 — Z 1,62 Å; 2 — 3,24; 3 — 4,86; 4 — 6,48; 5 — 8,10 Å

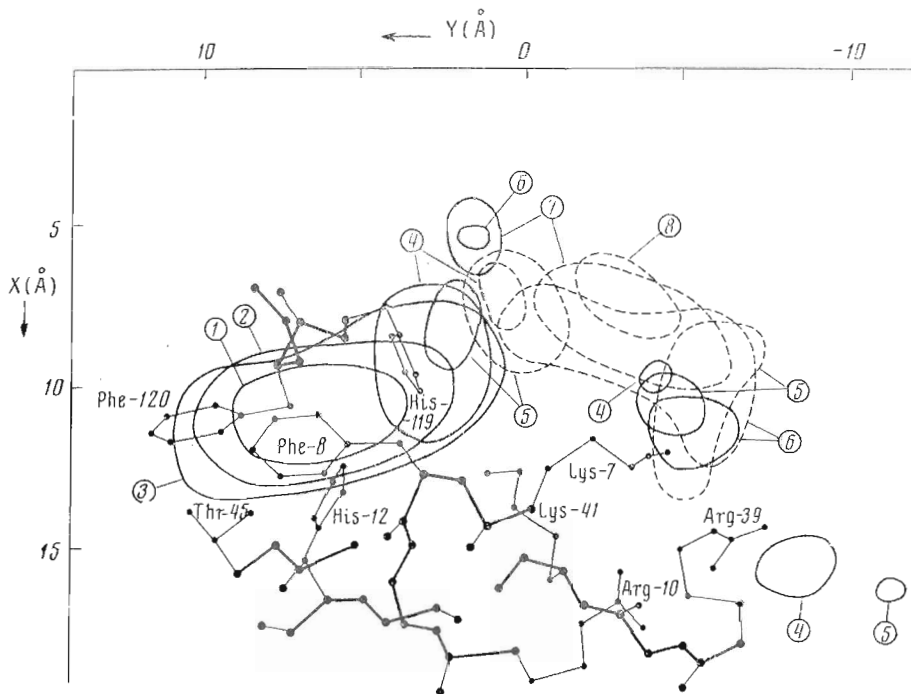


Рис. 5. Положение сечений разностных синтезов электронной плотности в проекции вдоль оси Z (P-Pxy)-ε-Lys-7-РНКазы S (штриховая линия) и комплекса ее с 3'-СМР (сплошная линия). Номера сечений: 1 — Z = 1,62 Å; 2 — 3,24; 3 — 4,86; 4 — 6,48; 5 — 8,10; 6 — 9,72; 7 — 11,34; 8 — 12,96 Å

эксперимента может повлечь за собой распад или полное отщепление пиридоксаминовой группировки. Не исключено, что в той или иной степени реализуются все три перечисленные возможности.

На разностном синтезе электронной плотности (P-Pxy)-ε-Lys-7-РНКазы S в комплексе с 3'-СМР при разрешении 5 Å удалось выделить три области

(рис. 4);  $B_1$  — область пиримидинового основания,  $R_1$  — область расположения рибозы и  $P_1$  — место расположения фосфатной группы нуклеотида.

При наложении разностных синтезов комплекса (P-Pxy)- $\epsilon$ -Lys-7-РНКазы S с нуклеотидом и РНКазы S, модифицированной по 41-му остатку лизина, оказалось, что пиридиновый цикл фосфопиридоксильного остатка в (P-Pxy)- $\epsilon$ -Lys-41-РНКазе S частью своей заходит в область  $R_1$ , фосфатная группа попадает в область  $P_1$  (рис. 4). Если обратиться к трехмерной модели молекулы РНКазы S, то можно видеть, что остаток пиридоксамин-Р, связанный с  $\epsilon$ -аминогруппой Lys-41 связью C—N, фиксирован многоточечными контактами в зоне активного центра и блокирует вход в щель активного центра, препятствуя специфическому связыванию нуклеотида.

Совершенно иная картина наблюдается в случае (P-Pxy)- $\epsilon$ -Lys-7-РНКазы S. Здесь пиридоксамин-Р заходит только в область  $P_1$  своей фосфатной группой (рис. 5): щель активного центра остается открытой и этого достаточно для того, чтобы нуклеотид вошел в нее и вытеснил фосфатную группу фосфопиридоксильного остатка из катионного участка. В данном случае ситуация близка к той, при которой фосфат- или сульфат-ион связаны в активном центре РНКазы и вытесняется оттуда при образовании специфического комплекса с нуклеотидами.

В работе по детальному исследованию физико-химических свойств фосфопиридоксил-РНКазы методами КД, УФ-, и ЯМР-спектроскопии было определено положение фосфопиридоксильного остатка относительно функциональных групп активного центра в растворе [3]. Сопоставление данных работы [3] и результатов, полученных в настоящей работе, показывает, что имеется качественное соответствие в положении фосфопиридоксильного остатка в третичной структуре РНКазы в кристалле и в растворе

### Экспериментальная часть

РНКазу S (фосфопиридоксил-РНКазу S) получали из РНКазы A (фосфопиридоксил-РНКазы A) по описанной ранее методике [3].

*Кристаллизация.* Кристаллы РНКазы S были выращены так же, как описано в работе [7]. Для получения кристаллов (P-Pxy)- $\epsilon$ -Lys-7(41)-РНКазы S методика была несколько изменена: 55 мг лиофилизованной, свободной от солей модифицированной РНКазы S растворяли в 0,75 мл 6 М CsCl, приливали 0,15 мл 2 М натрий-фосфатного буфера (рН 5,5) и при постоянном перемешивании осторожно добавляли 0,6 мл насыщенного раствора сульфата аммония. Прибавлением 1 М уксусной кислоты рН смеси доводили до 5,5 и фильтровали по 50—70 мкл в пробирки, которые плотно закрывали пробками. Кристаллы растут при комнатной температуре и через 7—10 сут достигают необходимых размеров. Для рентгеноструктурных исследований оптимальные размеры кристаллов  $0,4 \times 0,5 \times 0,6$  мм<sup>3</sup>. Перед съемкой кристаллы отмывали от CsCl раствором, содержащим 65% насыщения сульфата аммония и 0,2 М натрий-фосфатного буфера (рН 5,5).

Кристаллы РНКазы S (P-Pxy)- $\epsilon$ -Lys-7-РНКазы S и (P-Pxy)- $\epsilon$ -Lys-41-РНКазы S оказались изоморфны друг другу и изоморфны кристаллам РНКазы S, на которых проводились структурные исследования в группе Вайкофа (кристаллическая модификация Y в номенклатуре Вайкофа [7]).

*Рентгеновские измерения.* Измерения интенсивностей дифракционных отражений от кристаллов РНКазы S (фосфопиридоксил РНКазы S) проводили на трехкружном полуавтоматическом дифрактометре фирмы «Eunaf Nopius» (Голландия) с использованием фильтрованного  $\text{CuK}\alpha$  излучения. Режим измерений 30 кв. 32 ма. Применяли  $\omega$ -метод сканирования. Съемка в областях  $0^\circ \leq \chi \leq 90^\circ$  и  $30^\circ \leq \Phi \leq 150^\circ$  позволяла получить два эквивалентных набора интенсивностей ( $\sim 1200$  отражений).

При обработке интенсивностей вводили поправки на LP и поглощение (по методу Норта-Филлипса [8]) и усредняли интенсивности эквивалентных

Производная	$R_F = \frac{\Sigma  F_1 - F_W  *}{\Sigma F_1}$	$R_F' = \frac{\Sigma  F_1 - F_N  **}{\Sigma F_1}$
РНКаза S	0,10	—
(P-Pxy)-ε-Lys-41-РНКаза S	0,13	0,07
(P-Pxy)-ε-Lys-7-РНКаза S	0,12	0,07
(P-Pxy)-ε-Lys-7-РНКаза S + 3'-CMP	0,20	0,18

\*:  $F_W$  — модуль структурной амплитуды РНКазы S (по данным Вайкофа).

\*\*  $F_N$  — модуль структурной амплитуды РНКазы S (по данным авторов работы).

отражений. Для оценки точности эксперимента рассчитывали фактор рас-  
согласования интенсивностей эквивалентных отражений

$$R_F = \frac{\Sigma |F_1 - F_2|}{\Sigma F_1},$$

который для всех кристаллов не превышал 5%.

Сравнение наборов структурных амплитуд, полученных от кристаллов модифицированной РНКазы S, с набором структурных амплитуд для РНКазы S проводили по величине  $R_F$  (см. таблицу).

*Расчет и интерпретация разностных синтезов Фурье.* Разностные синтезы Фурье рассчитывали, как рекомендовано в работе [9], по коэффициентам Фурье

$$2m(kF_M - F_P) \exp i\varphi_P \quad \text{для рефлексов общего типа,}$$

$$m(kF_M - F_P) \exp i\varphi_P \quad \text{для центросимметричных рефлексов,}$$

где  $F_M$  — значение структурной амплитуды кристаллов РНКазы S, модифицированной пиридоксаль-Р,  $F_P$  и  $\varphi_P$  — значения амплитуды и фазы структурного фактора кристаллов РНКазы S по данным Вайкофа и соавт. (в качестве  $F_P$  брали также значения структурных амплитуд, полученных нами в результате съемки кристаллов немодифицированной РНКазы S),  $m$  — figure of merit — (показатель достоверности определения фаз — данные Вайкофа),  $k$  — шкальный фактор.

Для расчета синтезов Фурье использовали программы комплекса «Рентген», созданного в ФИХФ АН СССР под руководством Б. Л. Тарнопольского. Переход к моноклинной сигнонии (пространственная группа В 2), которая оказалась наиболее удобной при использовании программ этого комплекса, потребовал написания программы переиндексации и размножения рефлексов с последующей сортировкой и переходом к безиндексному виду записи.

Разностные синтезы, посчитанные с использованием в качестве  $F_P$  данных Вайкофа и данных, полученных нами при съемке кристаллов РНКазы S, в основном похожи, хотя в последнем случае уровень фона на разностных синтезах электронной плотности был заметно ниже.

Авторы выражают искреннюю признательность Э. Г. Арутюняну за помощь в выполнении эксперимента и при обсуждении результатов.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Richards F. M., Wyckoff H. W. (1971) in The Enzymes (Boyer P., ed.), vol. 4, Ed. 3, Chap. 24, p. 647—806, Academic Press, New York.
2. Allewell N. M., Mitsui Y., Wyckoff H. W. (1973) J. Biol. Chem., 248, 5291—5298.
3. Карпейский М. Я., Дудин С. М., Сахаровский В. Г., Шляпников С. В., (1974) в сб. Структура и функция активных центров ферментов, стр. 183—203, «Наука», М.
4. Abdallah M. A., Biemann J.-F., Nordström B., Bränden C.-I. (1975) Eur. J. Biochem., 50, 475—481.
5. Wyckoff H. W., Tsernoglou D., Hanson A. W., Knox J. R., Lee B., Richards F. M. (1970) J. Biol. Chem., 245, 305—328.



6. Richards F. M., Wyckoff H. W., Carlson W. D., Allewell N. M., Lee B., Mitsui Y. (1971) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 36, 35—43.
7. Wyckoff H. W., Hardman K. D., Allewell N. M., Inagami T., Tsernoglou D., Johnson L. N., Richards F. M. (1967) J. Biol. Chem., 242, 3749—3753.
8. North A. C. T., Phillips D. C., Mathews F. S. (1968) Acta Cryst., A24, 351—359.
9. Henderson R., Moffat J. K. (1971) Acta Cryst., B27, 1414—1420.

Поступила в редакцию  
28.V.1975

## X-RAY STUDIES OF RIBONUCLEASE S MODIFIED WITH PYRIDOXAL 5'-PHOSPHATE

BORISOVA S. N., PAVLOVSKY A. G., BORISOV V. V., KARPEISKY M. Ya.,  
VAINSHTEIN B. K., SOSFENOV N. I.

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

The details of three-dimensional structure of the active site of pancreatic ribonuclease have been studied by the X-ray analysis of crystals of modified ribonuclease S. The crystals of the two modifications of ribonuclease S were grown, with pyridoxal 5'-phosphate being combined at  $\epsilon$ -amino groups of Lys-7 and Lys-41. X-ray studies of these crystals at 5 Å resolution revealed the localization of the phosphopyridoxyl residue in the protein active site. In the case of Lys-41 modification the steric barriers to specific binding of nucleotides were observed.

---