



УДК 547.963.3 + 577.155.2

ЗОНДИРОВАНИЕ АКТИВНОГО ЦЕНТРА НЕКОТОРЫХ
ГУАНИЛСПЕЦИФИЧНЫХ РИБОНУКЛЕАЗ
МОДИФИЦИРОВАННЫМИ СУБСТРАТАМИ

Женодарова С. М., Гуляева В. И., Безбородова С. И.

Институт биологической физики и Институт биохимии
и физиологии микроорганизмов Академии наук СССР, Пущино

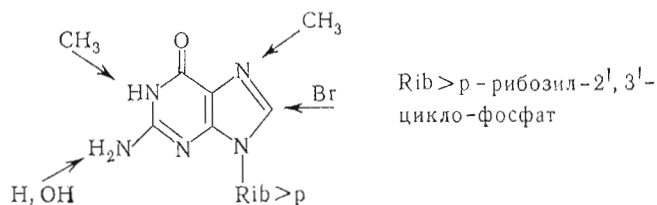
Для сравнительной оценки структуры контактных участков некоторых гуанил-специфичных рибонуклеаз (*Penicillium brevicompactum*, *Penicillium chrysogenum* 152A, *Aspergillus clavatus* и T₁) изучали синтез динуклеозидмонофосфатов, катализируемый этими ферментами, используя для синтеза субстраты (донор и акцептор фосфата), модифицированные в разных частях молекулы. Контактные участки (участки связывания) для донора фосфата в исследованных ферментах, по-видимому, неодинаковы; наиболее существенное значение для взаимодействия донора фосфата с ферментом имеют N₍₇₎- и N₍₁₎-атомы. Структура контактного участка, соответствующего акцептору фосфата, во всех изученных РНКазах сходна, а взаимодействие гетероциклического основания акцептора фосфата с ферментом происходит по крайней мере в трех «точках»: по 4-NH₂-группе, N₍₃₎- и O₍₂₎-атому. Изученные РНКазы могут быть использованы для синтеза олигорибонуклеотидов, содержащих такие необычные нуклеозиды, как инозин, ксантинозин, N⁴-ацетилцитидин, N³-метилцитидин, а также олигорибонуклеотидов, содержащих флуоресцентную «метку» — 3,N⁴-этепоцитидин.

Внеклеточные рибонуклеазы, продуцируемые микроскопическими грибами, отличаются друг от друга по специфичности действия на РНК, оптимуму pH и другим свойствам [1]. Рибонуклеазы с оптимумом pH в кислой области («кислые» РНКазы), как правило, не имеют определенной специфичности, а «щелочные» РНКазы расщепляют преимущественно связи гуаниловой или инозиновой кислот [2—5]. Субстратная специфичность синтетической функции некоторых «кислых» РНКаз была изучена в работах [6—11] при использовании субстратов, модифицированных в различных частях молекулы, что позволило определить минимальные требования к структуре субстратов, обеспечивающей связывание с ферментом и осуществление реакции (иными словами, определить сигнатуру молекулы субстрата [12]). В настоящей работе этот метод применен для сравнительной оценки структуры контактных участков (участков связывания) в некоторых гуанилспецифичных рибонуклеазах. Для этого изучали синтез динуклеозидмонофосфатов при участии четырех рибонуклеаз: двух ферментов рода *Penicillium* (*P. brevicompactum*, *P. chrysogenum* 152 A) и двух ферментов рода *Aspergillus* (*Asp. clavatus*, *Asp. oryzae*).

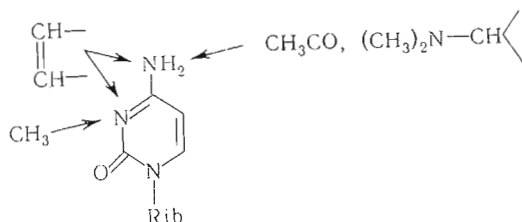
Принято считать, что образование межнуклеотидной связи, катализируемое рибонуклеазами, — реакция, обратная первой стадии расщепления межнуклеотидной связи [13]. Поэтому можно полагать, что контактные участки для 5'- и 3'-нуклеотидов, участвующих в образовании как синте-

зируемой, так и расщепляемой связи, совпадают. В случае синтеза мы говорим обычно об участках связывания донора и акцептора фосфата [11].

В качестве «стандартной» пары субстратов — донора и акцептора фосфата — использовали гуанозин-2',3'-циклофосфат ($G > p$)* и цитидин (C). Для модификации донора фосфата ($G > p$) были выбраны те «точки» в гуаниновом основании, которые, по литературным данным, могут быть ответственны за связывание в случае одного из наиболее изученных гуанилспецифичных ферментов — рибонуклеазы T_1 (*Aspergillus oryzae*) [15] и некоторых других гуанилспецифичных рибонуклеаз [16]:



Данные относительно контактного участка РНКазы T_1 или других гуанилспецифичных РНКаз, связывающего акцептор фосфата, в литературе отсутствуют. Поэтому в цитидине модификации подвергались те «точки», которые важны для функционирования цитидина как субстрата других рибонуклеаз [11]:



Таким образом, для зондирования активного центра гуанилспецифичных рибонуклеаз были использованы следующие субстраты: N^1 -метилгуанозин-2',3'-циклофосфат ($m^1G > p$), N^7 -метилгуанозин-2',3'-циклофосфат ($m^7G > p$), 8-бромгуанозин-2',3'-циклофосфат ($br^8G > p$), 2',3'-циклофосфаты инозина и ксантозина ($I > p$ и $X > p$) — доноры фосфата; N^4 -ацетилцитидин (ac^4C), N^4 -диметиламинометил-2',3'-O-этоксиметилцитидин ($m_2am^4C(>EtOMe)$), N^3 -метилцитидин (m^3C) и 3, N^4 -этенцитидин (ϵC) — акцепторы фосфата. За меру активности субстрата мы принимали выход динуклеозидмонофосфата [6]. Начальные концентрации субстратов и фермента были выбраны как описано ранее [6, 7]. Результаты синтезов представлены в табл. 1, 2. Динуклеозидмонофосфаты, синтезированные в настоящей работе, выделяли методами препаративных электрофореза или хроматографии на бумаге и очищали дополнительно хроматографией на бумаге. Структура полученных динуклеозидмонофосфатов подтверждалась обычными способами [6]. Характеристики синтезированных динуклеозидмонофосфатов приведены в табл. 3.

Для РНКазы *P. brevicompactum* наиболее активными донорами фосфата оказались $I > p$ и $X > p$ (табл. 1). Введение брома в положение $C_{(8)}$ гуанозин-2',3'-циклофосфата практически не влияет на выход динуклеозидмонофосфата. Небольшое снижение выхода наблюдается при метилировании $N_{(3)}$ -атома, а в случае метилирования по $N_{(7)}$ -положению синтез не идет совсем.

Более чувствительными к изменениям в структуре донора фосфата оказались РНКазы *P. chrysogenum* и РНКазы *Asp. clavatus*: $br^8G > p$ — ме-

* Сокращения соответствуют общепринятым [14].

Таблица 1

Выход динуклеозидмонофосфата при использовании модифицированных доноров фосфата в реакциях, катализируемых гуанилсцифичными рибонуклеазами

Донор фосфата	За 24 ч.				Максимальный *			
	<i>P. brev.</i>	<i>P. chr.</i>	<i>Asp. cl.</i>	T_1	<i>P. brev.</i>	<i>P. chr.</i>	<i>Asp. cl.</i>	T_1
G > p	30,8	43,1 42,2 **	39,9 45,1 **	— 41,2 **	30,8(24)	47,7(48)	47,2(48)	—
I > p	36,2	46,2	46,0	—	45,2(120)	52,5(48)	50,2(144)	—
X > p	35,6	10,8	5,9	33,6	44,1(168)	11,9(96)	13,2(144)	51,4(144)
br ⁸ G > p	31,9	14,7	14,2	24,3	32,5(48)	31,2(96)	20,4(48)	26,3(48)
m ¹ G > p	9,6	Синтез не идет		—	23,2(144)	Синтез не идет		—
m ⁷ G > p	Синтез не идет			—	Синтез не идет			—

* В скобках приведено время достижения максимального выхода в часах.

** Результаты получены для уменьшенной в 10 раз концентрации донора фосфата (см. «Экспериментальную часть»).

Таблица 2

Выход динуклеозидмонофосфата при использовании модифицированных акцепторов фосфата в реакциях, катализируемых гуанилсцифичными рибонуклеазами

Акцептор фосфата	За 24 ч.				Максимальный *			
	<i>P. brev.</i>	<i>P. chr.</i>	<i>Asp. cl.</i>	T_1	<i>P. brev.</i>	<i>P. chr.</i>	<i>Asp. cl.</i>	T_1
C	45,1	48,0 42,2 **	48,2 45,1 **	— 41,2 **	45,1(24)	48,0(24)	48,2(24)	—
ac ⁴ C	21,5	21,1	14,9	23,5	21,5(24)	21,1(24)	18,2(72)	23,5(24)
m ₂ am ⁴ C	12,9	16,8	10,8	14,9	12,9(24)	16,8(24)	15,0(72)	17,1(48)
> EtOMe								
m ³ C	25,3	25,0	11,7	22,8	26,4(96)	26,4(120)	19,5(120)	22,8(24)
εC	25,6	26,2	27,8	23,5	27,0(48)	34,1(96)	30,2(48)	28,0(96)

* В скобках приведено время достижения максимального выхода в часах.

** Результаты получены для уменьшенной в 10 раз концентрации G > p (см. «Экспериментальную часть»).

Таблица 3

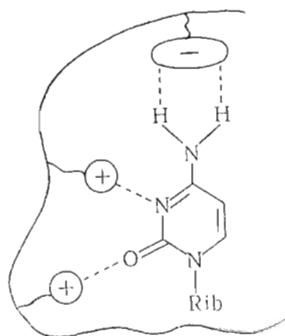
Характеристики полученных динуклеозидмонофосфатов

Динуклеозидмонофосфат	Состав	E_{Gp}	УФ-спектр в 0,1 н. HCl					
			$\lambda_{\text{макс}}$	$\lambda_{\text{мин}}$	$\frac{D_{250}}{D_{260}}$	$\frac{D_{270}}{D_{260}}$	$\frac{D_{280}}{D_{260}}$	$\frac{D_{290}}{D_{260}}$
GpC	1 : 1,02	0,4	278	235	0,76	1,09	1,12	0,74
IpC	1 : 1,11	0,53	248	225	1,30	0,92	0,75	
XpC	1 : 0,93		270	246	0,93	1,15	0,93	0,65
m ¹ GpC	1 : 0,90	0,43	277	237	0,75	1,09	1,08	0,83
br ⁸ GpC	1 : 1	0,44	270	237	0,82	1,06	1,00	0,72
Gpac ⁴ C	1 : 1,08	0,43	252	231	1,06	0,82	0,80	0,67
Gpm ³ C	1 : 1,07	0,44	277	235	0,79	1,05	0,72	0,72
GpeC	1 : 1,06	0,47	260	235	0,91	1,03	1,03	0,80
Gpm ₂ am ⁴ C > EtOMe	1 : 0,88	0,42	276	234	0,83	1,00	0,99	0,73

нее активный субстрат, чем G > p; замена 2-эзо-NH₂-группы на гидроксил приводит к резкому снижению активности донора по отношению к обоим этим ферментам, и, наконец, критической оказалась модификация как по N₍₇₎-, так и по N₍₁₎-положению.

Таким образом, из анализа полученных результатов следует: 1) контактные участки для допора фосфата (5'-нуклеотида расщепляемой связи) в исследованных РНКазах неодинаковы, причем большие различия в их структуре наблюдаются внутри одного рода (см. *Asp. clavatus* и *Asp. oryzae*, *P. brevicompactum* и *P. chrysogenum*); 2) наиболее существенное значение для взаимодействия субстрата с ферментом имеют $N_{(7)}$ - и $N_{(4)}$ -атомы, хотя не исключено, что непосредственного участия во взаимодействии с ферментом эти точки (или какая-либо из них) не принимают, а влияние модификации по этим местам связано с изменением распределения электронной плотности в молекуле субстрата.

Анализ данных по использованию модифицированных акцепторов фосфата (см. табл. 2) показывает, что для всех изученных в настоящей работе РНКаз структура контактного участка, соответствующего акцептору фосфата, сходна, а наиболее активным акцептором фосфата является цитидин*. Результаты замещения 4-NH₂-группы и метилирования 3-N-атома говорят о том, что эти «точки» важны для взаимодействия, однако εС, где модификация осуществлена одновременно по 3-N-атому и 4-NH₂-группе, оказался более хорошим субстратом, чем первые. Учитывая распределение электронной плотности в применявшихся акцепторах фосфата [11], можно предполагать, что уменьшение активности ас⁴С и м³С связано с появлением отрицательного заряда вблизи N₍₄₎-атома в первом случае и положительного заряда вблизи N₍₃₎-атома во втором. Для εС положительный заряд вблизи N₍₄₎-атома лишь немного меньше, чем в цитидине, а положительный заряд вблизи N₍₃₎-атома, меньший по величине, чем в м³С, снижает активность εС в меньшей степени. По-видимому, взаимодействие гетероциклического основания акцептора фосфата с ферментом происходит по крайней мере в трех точках, поэтому ослабление контакта только в одной из них не является критическим. Таким образом, контактный участок, соответствующий акцептору фосфата (3'-нуклеотиду расщепляемой связи), схематически может быть представлен в следующем виде:



Экспериментальная часть

В работе использовали цитидин, гуанозин-2'(3')-фосфат (Ва-соль) и аденозин-2'(3')-фосфат (Na-соль) фирмы «Reanal» (Венгрия). Инозин-2'(3')-фосфат и ксантозин-2'(3')-фосфат получали дезаминированием соответствующих производных аденозина и гуанозина по методике [17]. 2',3'-Циклофосфаты гуанозина, инозина и ксантозина синтезировали по способу Шугара [18]. 1-Метилгуаниловую кислоту получали согласно работе [19], 7-метилгуаниловую кислоту — по методу [20], 8-бромгуанозин 2'(3')-фосфат — в соответствии с работой [21]. Циклизацию 2'(3')-фосфа-

* Следует иметь в виду, что интерпретация всех полученных в этом случае результатов должна быть отнесена к конформации ферментов, соответствующей применявшимся условиям, пока не выяснено влияние концентрации на активность акцептора фосфата.

тов 1-метилгуанозина, 7-метилгуанозина и 8-бромгуанозина проводили, используя *n*-толуолсульфонат циклогексил- β -[N-(N'-метилморфолиний)]-этилкарбодимид [22]. Получение N⁴-ацетилцитидина, N³-метилцитидина и 3,N⁴-этеоцитидина описано в работах [7, 10]. N⁴-Диметилгаминометилен-2',3'-О-этоксиметиленцитидин приготовлен по методике работы [23].

Выделение и очистку внеклеточных гуанилспецифичных рибонуклеаз *Penicillium brevicompactum*, *Penicillium chrysogenum* 152A, *Aspergillus clavatus* (КФ 2.7.7.26) осуществляли согласно работам [2—5]. За единицу активности принимали количество рибонуклеазы, способное расщепить 1 мкмоль нуклеозид-2',3'-циклофосфата ($G > p$) за 30 мин при 37°. Коммерческий препарат рибонуклеазы T₁ (*Aspergillus oryzae*) (КФ 2.7.7.26) фирмы «Sanryo LTD» (Япония) использовали без дополнительной очистки.

Хроматографию, электрофорез на бумаге и УФ-спектрофотометрирование проводили в условиях, описанных в работах [6, 7, 10].

Синтез динуклеозидмонофосфатов. Буферный раствор (0,1 мл), содержащий нуклеозид-2',3'-циклофосфат, нуклеозид и фермент, инкубировали при ~4°. Пробы реакционной смеси анализировали через определенные промежутки времени методом электрофореза или хроматографии на бумаге с последующим спектрофотометрированием элюатов (H₂O, pH 7,0) пятен, соответствующих отдельным компонентам реакционной смеси. Синтезы с модифицированными донорами фосфата проводили в следующих условиях: начальные концентрации нуклеозид-2',3'-циклофосфата, цитидина и РНКазы составляли 0,25; 0,75 М и 60 ед/мл соответственно; 0,2 М фосфатный буфер, pH 7,8 (РНКазы *P. chrysogenum* 152A и РНКазы *Asp. clavatus*); 0,2 М трис-ацетатный буфер, pH 7,2 (РНКазы *P. brevicompactum* и РНКазы T₁). GrC с участием РНКазы *Asp. clavatus*, *P. chrysogenum* 152A и T₁ был синтезирован также при [G > p] 0,02 М; [C] 0,5 М; [РНКазы] 100 ед/мл в течение 2,5 ч [24]. В случае модифицированных акцепторов фосфата начальные концентрации гуанозин-2',3'-циклофосфата, нуклеозиды и РНКазы были 0,125; 0,375 М и 60 ед/мл соответственно.

ЛИТЕРАТУРА

1. Эгами Ф., Такахаси К., Усида Ц. (1966) в сб. Нуклеиновые кислоты (под ред. Збарского И. Б.), с. 144—190, «Мир», М.
2. Безбородова С. И., Ильина Т. В., Крупянко В. И. (1971) Докл. АН СССР, 196, 1460—1462.
3. Безбородова С. И., Суходольская Г. В., Гуляева В. И., Ильина Т. В. (1974) Прикл. биохимия и микробиол., 10, 432—437.
4. Безбородова С. И., Грищенко В. М., Маркелова Н. Ю. (1973) Биохимия, 38, 336—343.
5. Морозова В. Г., Безбородова С. И. (1972) Биохимия, 37, 959—965.
6. Седелникова Э. А., Клягина В. П., Женодарова С. М. (1973) Молекулярн. биология, 7, 27—36.
7. Масленникова Т. А., Седелникова Э. А., Клягина В. П., Женодарова С. М. (1973) Молекулярн. биология, 7, 36—41.
8. Гуляева В. И., Женодарова С. М. (1972) 5219—72 Дец. ВИНТИ от 20.12.72.
9. Гуляева В. И., Багдасарян З. Н., Безбородова С. И., Женодарова С. М. (1974) Молекулярн. биология, 8, 261—265.
10. Женодарова С. М., Седелникова Э. А., Смолянинова О. А., Шибасв В. Н., Кост. А. А. (1975) Биоорг. химия, 1, 1345—1351.
11. Женодарова С. М., Голованов И. В., Соболев В. М. (1976) Изв. АН СССР. Сер. хим., 1846—1850.
12. Волькенштейн М. В. (1975) Молекулярн. биофизика, с. 35—36, «Наука», М.
13. Richards F. M., Wyckoff H. W. (1971) in Enzymes, v. IV, 3 ed., p. 647—806, Acad. Press, New York—Amsterdam.
14. IUPAC — IUB Commission on Biochemical Nomenclature (1970) Eur. J. Biochem., 15, 203—208.
15. Takahashi K. (1972) J. Biochem., 72, 1469—1481.
16. Ivanova G. S., Holy A., Zelinkova E., Bezborodova S. I., Abrosimova-Ameljanchik N. M., Tatarskaja R. I. (1974) Collect. Czech. Chem. Commun., 39, 2986—2997.
17. Shapiro R., Rohl S. M. (1968) Biochemistry, 5, 2722—2728.

18. Shugar D. (1967) in *Methods Enzym.*, v. XII, part A, p. 131—133.
19. Броуде Н. Е., Будовский Э. И. (1967) *Молекулярн. биология*, **1**, 214—223.
20. Jones J. W., Robins R. K. (1963) *J. Amer. Chem. Soc.*, **85**, 193—201.
21. Ikehara M., Tazawa J., Fukui T. (1969) *Chem. and Pharm. Bull.*, **17**, 1019—1021.
22. Кавунцако А. П., Морозова Э. Н., Тихомирова-Сидорова Н. С. (1971) *Ж. общ. химии*, **41**, 226—232.
23. Zemlicka J., Chladek S., Holy A., Smrt J. (1966) *Collect. Czech. Chem. Commun.*, **31**, 3198—3203.
24. Mohr S., Thach R. (1969) *J. Biol. Chem.*, **244**, 6566—6576.

Поступила в редакцию
30.XII.1975

После переработки
13.II.1976

PROBING OF THE ACTIVE CENTRE OF SOME GUANYL-SPECIFIC RIBONUCLEASES WITH MODIFIED SUBSTRATES

ZHENODAROVA S. M., GULYAEVA V. I., BEZBORODOVA S. I.

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

For the comparative analysis of binding sites of some guanyl-specific ribonucleases (*Penicillium brevicompactum*, *Penicillium chrysogenum* 152A, *Aspergillus clavatus* and T₁) the dinucleoside monophosphate synthesis with modified substrates (phosphate donors and phosphate acceptors) was studied. It appears that the binding sites for phosphate donor are different in the enzymes tested, large differences being observed for congeneric ribonucleases [*P. brevicompactum*] and *P. chrysogenum*, *Asp. clavatus* and *Asp. oryzae*. The N₍₇₎- and N₍₁₎-atoms are most essential for the interaction of phosphate donor and enzyme. The contact sites which correspond to phosphate acceptor are similar in these ribonucleases. The interaction of phosphate acceptor and enzyme occurs at least at three «points»: at 4-NH₂-group, N₍₃₎- and O₍₂₎-atom. The studied ribonucleases can be used for the synthesis of oligoribonucleotides containing such unusual nucleosides as inosine, xantosine, N⁴-acetylcytidine, N⁴-methylcytidine and also oligoribonucleotides containing fluorescent label — 3,N⁴-ethenocytidine.