



УДК 577.155.2 : 547.963.32.07

О ВЗАИМОДЕЙСТВИИ ПИРИМИДИНСПЕЦИФИЧНОЙ  
РИБОНУКЛЕАЗЫ А С ПУРИНОВЫМИ НУКЛЕОТИДАМИ*Антонов И. В., Карнейский М. Я., Падюкова Н. Ш.,  
Яковлев Г. И.**Институт молекулярной биологии Академии наук СССР, Москва**Сахаровский В. Г.**Институт биохимии и физиологии микроорганизмов Академии наук СССР, Пушкино*

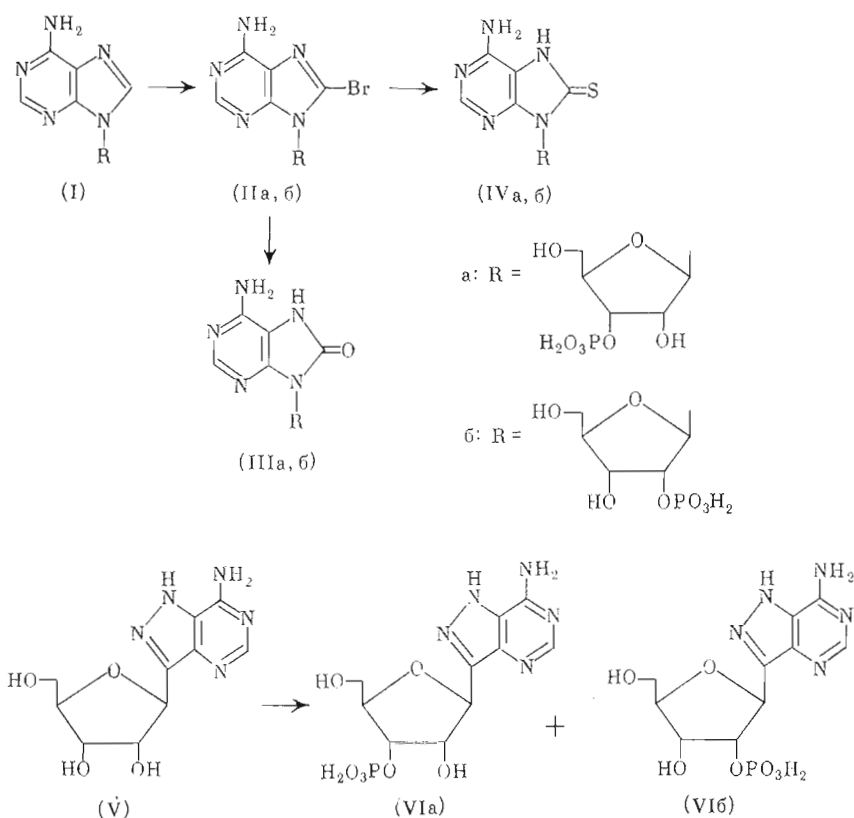
Для выяснения молекулярных основ пириимидиновой специфичности рибонуклеазы А синтезированы 8-Вг-3'-АМР, 8-оксо-3'-АМР, 8-тио-3'-АМР и формицин-3'-фосфат. Установлено, что для всех синтезированных соединений в конформационном равновесии, характеризующем взаиморасположение основания и рибозы, преобладает *син*-ковформер. Методом ПМР показано, что только 8-оксо-3'-АМР связывается в пириимидинсвязывающем центре фермента. Полученные результаты свидетельствуют о том, что для образования продуктивного фермент-субстратного комплекса комплементарность между ферментом и субстратом является абсолютной только в области узнавания.

Панкреатическая рибонуклеаза А катализирует расщепление фосфодиэфирной связи в РНК с образованием соответствующих циклофосфатов и гидролиз последних до 3'-фосфатов нуклеозидов. Показано, что скорость расщепления РНК и гомополирибонуклеотидов зависит от нуклеотидного состава субстрата и наибольшая скорость наблюдается для связей типа пириимидин — пурин. В реакции гидролиза циклофосфатов фермент проявляет более выраженную специфичность, и расщеплению подвергаются только пириимидиновые нуклеотиды [1]. При рентгеноструктурном анализе комплексов РНКазы с различными нуклеотидами было показано, что в активном центре имеется участок связывания пириимидиновых нуклеотидов (центр В<sub>1</sub>) и область, в которой связывается пуриновый нуклеотид (центр В<sub>2</sub>). Пириимидиновое основание специфического субстрата фиксируется в центре В<sub>1</sub> тремя водородными связями, при этом фосфорибозильный фрагмент субстрата оказывается расположенным в непосредственной близости от каталитических групп активного центра фермента His<sup>12</sup>, His<sup>119</sup>, Lys<sup>41</sup> [2].

Была высказана гипотеза, согласно которой дискриминация между пуриновыми и пириимидиновыми нуклеотидами является следствием необходимости образования водородных связей Ser<sup>123</sup> и Thr<sup>45</sup> с соответствующими группами гетероциклического основания нуклеотида. В случае пириимидиновых нуклеотидов водородные связи фиксируют основание в положении, которое обеспечивает оптимальную ориентацию фосфорибозильного фрагмента. Для пуриновых нуклеотидов это требование либо невыполнимо, либо приводит к образованию непродуктивного фермент-

субстратного комплекса, т. е. такого комплекса, в котором фосфорильный остаток оказывается удаленным от каталитических групп активного центра фермента [3]. Однако эта гипотеза не согласуется с тем, что РНКаза А расщепляет не только пириимидиновые полирибонуклеотиды, но и poly(A) (существенно медленнее, чем poly(C) или poly(U)), причем в реакции принимает участие те же каталитические группы фермента [4]. Вместе с тем обнаруженные при рентгеноструктурном анализе комплексов РНКазы с пириимидиновыми нуклеотидами водородные связи (или некоторые из них), безусловно, имеют непосредственное отношение к присущей РНКазе А «пириимидиновой» специфичности. Такой вывод основывается на рассмотрении данных по субстратной специфичности РНКазы А, полученных при изучении гидролиза аналогов нуклеозид-циклофосфатов [1]. Из этих данных следует, что обязательным элементом структуры субстрата является «амидный» фрагмент основания, примыкающий к гликозидной связи, т. е. тот фрагмент, который может образовать водородные связи с Thr<sup>45</sup>.

Настоящая работа посвящена экспериментальному изучению взаимодействия различных производных 3'-адениловой кислоты с РНКазой А для выяснения закономерностей образования продуктивных фермент-субстратных комплексов, определяющих субстратную специфичность фермента. Для проведения такого исследования нами был осуществлен синтез 8-бром-, 8-оксо-, 8-тио-3'-адениловой кислот и формацин-3'-фосфата (схема).



При бромировании аденозин-3'-фосфата образуется смесь 2'(3')-фосфатов; следовательно, в процессе реакции и выделения продуктов происходит существенная 3'  $\rightarrow$  2'-миграция фосфатной группы. Смесь 2'(3')-фосфатов аденозина бромировали по описанному методу [5] с некоторыми изменениями на стадии выделения продуктов реакции.

Характеристики 8-замещенных АМР

Соединение	$R_f$	УФ, $\lambda_{\text{макс}}$ , нм ( $\epsilon$ )		
		pH 1	pH 7	pH 13
8-Br-3'-AMP (IIa)	0,8	263 (16400)	266 (15100)	266 (14700)
8-Br-2'-AMP (IIб)	0,86	263 (16000)	266 (15000)	266 (15000)
8-Оксо-3'-AMP (IIIa)	0,36	264,6 (8100); 285,7 (7800)	270 (9800)	281 (11700)
8-Оксо-2'-AMP (IIIб)	0,44	263 (6800); 286 (6100)	270 (9100)	283 (9100)
8-Тио-3'-AMP (IVa)	0,4	245 (9100); 312 (28900)	230 (17000); 298 (33100); 307 (3100)	230 (20300); 298 (20300)
8-Тио-2'-AMP (IVб)	0,59	244 (9600); 310 (22600)	230 (17400); 298 (22900); 305 (22600)	227 (20700); 297 (20000)
Формиция (V)	0,7	235 (8100); 297 (9600); 306 (8500)	230 (6800); 287 (9500); 295 (10400); 307 (7000)	235 (16000); 306 (7000)
Формицин-3'-P (VIa)	0,4	234 (7500); 296 (9600); 305 (8200)	230,5 (6000); 286 (8400); 295 (9300); 305 (8400)	234 (14600); 305 (7000)
Формицин-2'-P (VIб)	0,44	234 (7000); 295 (9600); 305 (8000)	230 (5500); 285 (8000); 295 (9000); 303 (8000)	234 (14000); 303 (6800)

Таблица 2

Химические сдвиги и константы спин-спинового взаимодействия протонов 8-замещенных производных аденозина в  $D_2O$ , pD 5,5 и 32°

Соединение	$\delta$ , м.д.							$J_{\text{HH}}$ , Гц		
	2'-H	1'-H	2'-H	3'-H	4'-H	5'-Ha	5'-Hб	1',2'	2',3'	3',4'
8-Br-3'-AMP	8,08	6,12	5,02	4,74	4,52	3,95	3,95	6,8	2,3	2,7
8-Br-Ado *	—	—	—	—	—	—	—	6,8	5,1	2,8
Формицин-3'-P	8,67	5,68	4,74	4,88	4,55	4,06	4,16	6,6	5,0	3,2
Формицин *	—	—	—	—	—	—	—	6,9	5,0	3,4
8-Оксо-3'-AMP	8,16	6,62	5,16	4,90	4,54	3,98	4,02	6,8	6,2	2,5
8-Тио-3'-AMP	8,05	5,95	5,06	4,84	4,44	3,92	3,99	6,8	6,5	2,5

\* Лит. данные [10], в качестве растворителя использовался жидкий  $NH_3$ ,  $t$  40°.

8-Оксоаденозин-3'-фосфат и 8-меркаптоаденозин-3'-фосфат получали по методам, описанным для соответствующих 5'-фосфатов [6, 7].

3'-Фосфат формицина был получен ранее с небольшим выходом из формицина [8] пятистадийным синтезом. Мы осуществили синтез 3'-фосфата в одну стадию селективным фосфорилированием незащищенного формицина триметафосфатом в водном растворе [9].

Структура полученных аналогов 3'-АМР доказана с помощью УФ- и ПМР-спектров (табл. 1, 2). Интересно, что 8-оксо-3'-АМР и 8-тио-3'-АМР имеют спектральные характеристики, сходные с соответствующими нуклеозидами, которые в водном растворе существуют преимущественно в кетоформе [11—13]. Мы изучили методом ПМР конформационное состояние синтезированных 8-замещенных аналогов 3'-АМР в водном раство-

ре (табл. 2). На основании величины констант спин-спинового взаимодействия можно судить о конформационном состоянии рибозы в растворе [14, 15]. В свою очередь, для нуклеозидов пуринового ряда экспериментально показано существование корреляции между конформацией рибозы и ориентацией гетероциклического основания относительно рибозного кольца: преимущественной *син*-ориентации основания соответствует большая населенность  $S$  ( ${}^2E$ )-состояния рибозы, чем  $N$  ( ${}^3E$ )-состояния [16, 17]. Населенность  $S$ -состояния рибозы, выраженная в процентном отношении, для нуклеозидов и нуклеозидфосфатов в водных растворах может быть рассчитана как  $10 J_{1',2'}$  [14]. Из приведенных в таблице данных видно, что для всех исследованных соединений конформационное равновесие сминуто в сторону  $S$ -типа ( $J_{1',2'} > 5$  Гц). Более того, константы спин-спинового взаимодействия протонов рибозного фрагмента для 8-замещенных производных 3'-АМР и формицинофосфата практически совпадают с соответствующими константами для 8-бромаденозина и формицина, для которых ранее установлена преимущественная *син*-ориентация основания в растворе [10, 18]. Исключение составляет константа  $J_{2',3'}$  для 8-оксо- и 8-тио-3'-АМР, величина которой более чем на 1 Гц превышает соответствующие значения для 8-Br-3'-АМР. Это означает, согласно [14], что для 8-оксо- и 8-тио-3'-АМР фазовый угол и амплитуда псевдовращения несколько отличаются от аналогичных величин для 8-бромаденозина, формицина и их фосфорилированных производных. Таким образом, для всех исследованных аналогов 3'-АМР в конформационном равновесии преобладает *син*-конформер.

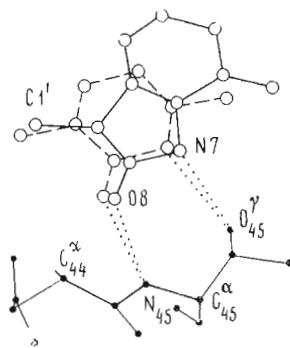


Рис. 1 Положение пиримидинового нуклеотида в *анти*- и *пури*нового нуклеотида в *син*-конформации в центре  $B_1$

Рассмотрение молекулярных моделей показывает, что фосфорибозильный фрагмент (реагирующая группа субстрата) и амидный фрагмент (узнаваемая группа субстрата) исследуемых пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов могут быть совмещены. В том случае, когда пиримидиновый нуклеотид находится в *анти*-конформации, условием совмещения является *син*-конформация 8-замещенного пуринового нуклеотида (рис. 1). Если для проявления субстратной специфичности РНКазы А геометрическое соответствие между пиримидиновым основанием и центром  $B_1$  фермента является не только необходимым, но и достаточным условием, то все синтезированные соединения должны были бы связаться в этом центре. Различия в размере гетероциклического основания пуринов и пиримидинов при таком расположении аналогов 3'-АМР в центре  $B_1$  не имеют значения, поскольку пиримидиновый цикл пуринового основания выходит за пределы центра  $B_1$  и вообще может не иметь контактов с белком.

Метод ПМР позволяет детектировать образование комплекса РНКазы А с нуклеотидами в растворе по характерным изменениям химических сдвигов протонов основания нуклеотида и протонов белка. Связывание пиримидиновых нуклеотидов (центр  $B_1$ ) при рН 5,5 вызывает сдвиг сигналов протонов 6-Н и 5-Н гетероциклического основания в слабое поле на  $\sim 0,25$  и  $\sim 0,1$  м. д. соответственно. При этом сигналы протонов ароматического кольца Тур<sup>25</sup> сдвигаются в сильное поле на  $\sim 0,35$  м. д., а С2Н-протоны His<sup>48</sup> — в слабое поле на  $\sim 0,1$  м. д. [19, 20]. Образование комплекса между пуриновым нуклеотидом и РНКазой А в этих же условиях сопровождается сдвигом сигналов протонов основания в сильное поле, а сдвиг сигналов протонов Тур<sup>25</sup> отсутствует. Положение С2Н-сигнала His<sup>48</sup> остается неизменным в случае связывания 3'- и 5'-АМР, но этот сигнал сдвигается в слабое поле при связывании 2'-АМР [20].

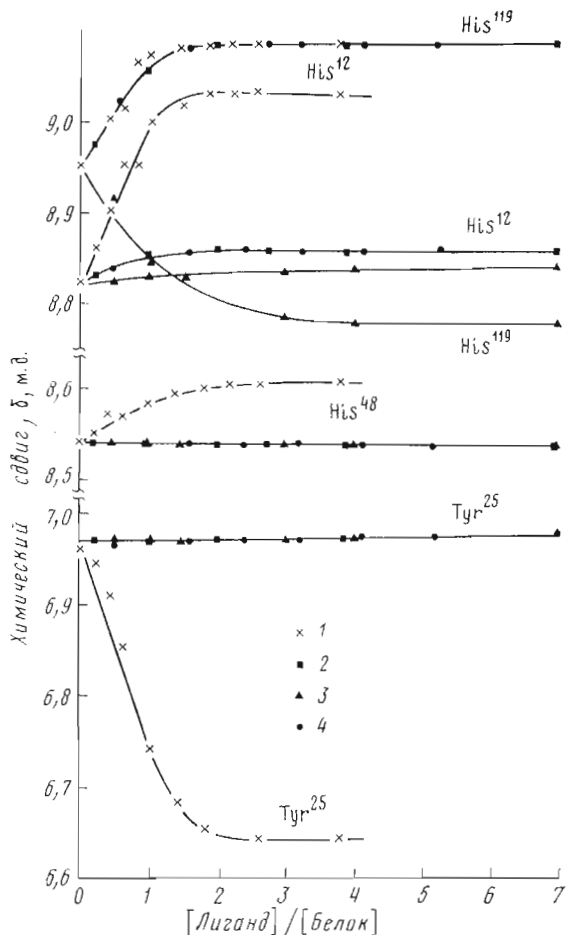


Рис. 2. Зависимость химических сдвигов мета-протонов фенольного кольца Tyr<sup>25</sup> и C2H-протонов имидазольного кольца гистидиновых остатков рибонуклеазы А от отношения молярных концентраций лиганд — белок в D<sub>2</sub>O для 8-замещенных аналогов 3'-AMP: 1 — 8-оксо-, 2 — 8-тио-, 3 — 8-Br-3'-AMP, 4 — формилин-3'-P. Концентрация РНКазы 5 мМ (8-оксо-3'-AMP) и 10 мМ (остальные нуклеотиды); рD 5,8 и 32°

Таким образом, единственным надежным критерием, позволяющим установить, связываются ли производные 3'-адениловой кислоты в пиримидинспецифическом центре В<sub>1</sub>, является сдвиг сигналов протонов Tyr<sup>25</sup>. В проведенных нами экспериментах регистрировалось положение этих сигналов при последовательном увеличении отношения концентраций нуклеотид — белок до значений 10 : 1. Из рис. 2 видно, что только в случае 8-оксоаденозин-3'-фосфата в спектре ПМР фермента наблюдается изменение положения сигналов протонов Tyr<sup>25</sup>, характеризующее образование комплекса, в котором нуклеотид фиксирован в пиримидинсвязывающем участке активного центра фермента. При концентрациях белка 0,01 М и нуклеотида вплоть до 0,1 М остальные нуклеотиды не вызывают изменения химических сдвигов протонов Tyr<sup>25</sup>, и, следовательно, константы связывания этих производных 3'-AMP в центре В<sub>1</sub> РНКазы А меньше 10.

Существенной характеристикой комплекса РНКазы А с 8-оксо-3'-AMP служат константы ионизации гистидиновых остатков фермента в комплексе. С этой целью была изучена рН-зависимость сигналов C2H-протонов гистидиновых остатков (рис. 3) и определены величины рК (His<sup>12</sup> — 6,8;

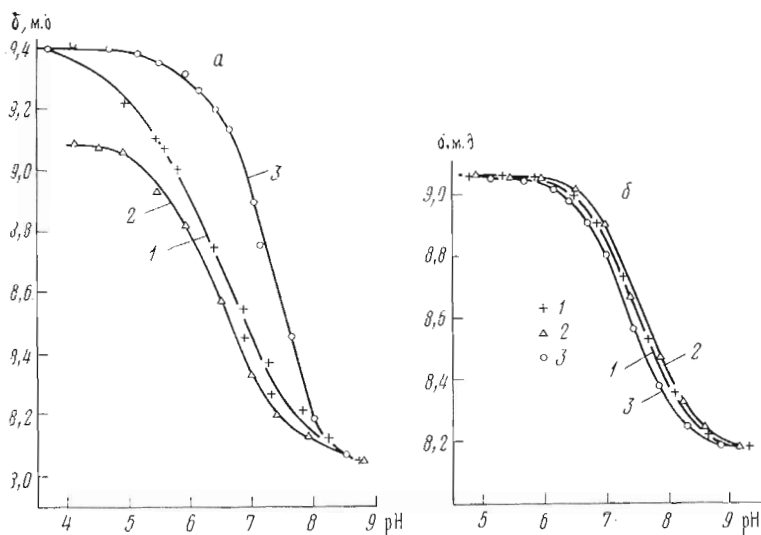


Рис. 3. Зависимость химических сдвигов С2Н-протонов имидазольного кольца остатка His<sup>12</sup> (а) и His<sup>119</sup> (б) рибонуклеазы А в комплексе с 8-оксо-3'-АМР (1), 3'-УМР (2) и 3'-СМР (3) от рН. Концентрация рибонуклеазы А 5 мМ; молярное отношение нуклеотид—белок 4 : 1; 32°;  $I = 0,25$  М (0,2 М NaCl + 0,05 М CH<sub>3</sub>COONa)

His<sup>119</sup>—7,8; His<sup>105</sup>—6,7; His<sup>48</sup>—6,4), которые оказались близки к значениям рК соответствующих гистидиновых остатков в комплексе РНКазы А—3'-УМР [20]. Таким образом, совокупность полученных данных позволяет нам утверждать, что 8-оксо-3'-АМР связывается с РНКазой А в том же участке активного центра, что и пиримидиновые нуклеотиды. Более того, свойства образующегося комплекса практически не отличаются от свойств специфических комплексов РНКазы А с пиримидиновыми нуклеотидами. Анализ полученных результатов с использованием трехмерной модели молекулы рибонуклеазы показывает, что 8-оксо-3'-АМР в *син*-конформации легко вписывается в участок связывания пиримидиновых нуклеотидов. При этом фосфатная группа занимает центр Р<sub>1</sub>, рибозный остаток — R<sub>1</sub>, а пуриновое кольцо фиксируется в центре В<sub>1</sub> [1], обеспечивая максимальную комплементарность между белком и амидным фрагментом 8-оксо-3'-АМР. В таком комплексе атомы N7 и O8 имидазольного цикла пуринового основания расположены на расстоянии 3—3,5 Å от ОН- и NH-групп Thr<sup>45</sup>, что является необходимым условием для образования соответствующих водородных связей.

Следовательно, не существует геометрических ограничений для связывания пуриновых нуклеотидов в пиримидинспецифическом центре рибонуклеазы. Фиксация нуклеотида в этом участке активного центра определяется наличием в гетероциклическом основании нуклеотида амидного фрагмента, находящегося рядом с гликозидной связью и способного образовывать водородные связи с Thr<sup>45</sup>.

Таким образом, абсолютная пиримидиновая специфичность РНКазы А в реакции гидролиза нуклеозидциклофосфатов обусловлена тем, что пурины не связываются в пиримидинспецифическом участке активного центра фермента. Доводом в пользу такой гипотезы является то обстоятельство, что 8-бром- и 8-тио-производные 3'-АМР, так же как и формицин-3'-фосфат, не связываются в пиримидинспецифическом участке активного центра фермента. Эти соединения, хотя и имеют близкие геометрические параметры с 8-оксо-3'-АМР, различаются по способности атомов, находящихся в положении 8 пуринового основания, выступать в качестве акцепторов водородной связи [21]. Очевидно, что именно это свойство является ответ-

ственным за наблюдаемые различия в характере связывания аналогов 3'-АМР с РНКазой А.

Результаты данной работы подтверждают выдвинутую нами ранее гипотезу о субстратной специфичности ферментов, согласно которой комплементарность между ферментом и субстратом абсолютна только в области узнавания, поскольку это необходимое условие образования водородных связей, определяющих узнавание, т. е. формирование продуктивного фермент-субстратного комплекса [22].

### Экспериментальная часть

УФ-спектры сняты на приборе Spexord UV VIS (ГДР). Спектры КД сняты на дихрографе Jobin Yvon Marck III (Франция). Хроматографию проводили на пластинках силуфол UV<sub>254</sub> (Чехословакия), в системе изо-пропанол — аммиак — вода (7 : 1 : 2). Свойства полученных соединений представлены в табл. 1 и 2.

*8-Бромаденозин-3'- и 2'-фосфат (IIa) и (IIб).* К раствору 1041 мг (3 ммоль) аденозин-2' (3')-фосфата (I) в 8 мл 1 н. NaOH и 160 мл ацетатного буфера, рН4, добавляли бромную воду (0,8 мл брома в 50 мл воды) и реакционную смесь оставляли на 12 ч при 20°. Раствор концентрировали в вакууме, остаток упаривали со спиртом, растворяли в 100 мл воды и наносили на колонку с дауэксом-1 (Cl<sup>-</sup>-форма, 2 × 45 см), промывали водой и элюировали линейным градиентом от 0,03 до 0,08 М LiCl, содержащим 0,003 н. HCl, объем 9 л. Фракции, содержащие 8-бромаденозин-2'-фосфат (IIб) и 3'-фосфат (IIa) (элюирующая концентрация LiCl 0,042 и 0,062 М соответственно, контроль по УФ-поглощению при 260 нм), нейтрализовали до рН 7,5 раствором LiOH, упаривали, добавляли 100 мл спирта, упаривали в вакууме досуха, Li-соль нуклеотида промывали безводным этанолом до отсутствия хлор-иона в фильтрате. Выход дилитиевой соли 8-бромаденозин-3'-фосфата 360 мг и дилитиевой соли 8-бромаденозин-2'-фосфата 94 мг.

*8-Оксоаденозин-3'- и 2'-фосфат (IIIa) и (IIIб).* Раствор 250 мг (0,57 ммоль) дилитиевой соли 8-бромаденозин-3'-фосфата (IIa) в 20 мл абс. пиридина упаривали досуха, упаривали с абс. пиридином (3 × 20 мл), добавляли 94 мг свежепрокаленного AsONa (1,14 ммоль) и 5 мл уксусного ангидрида. Смесь кипятили 2 ч и оставляли на 16 ч при 20°. К реакционной смеси добавляли 10 мл метанола, упаривали досуха, упаривали с метанолом (5 × 10 мл), добавляли 15 мл 1 н. NaOH и оставляли на 5 сут при 20°. Раствор нейтрализовали 1 н. HCl до рН 7, затем довели до рН 8 конц. NH<sub>4</sub>OH, разбавляли водой до 300 мл и раствор наносили на колонку с дауэксом-1 (Cl<sup>-</sup>-форма, 1 × 20 см), промывали водой и элюировали линейным градиентом LiCl от 0,03 до 0,1 М, содержащим 0,003 н. HCl, объем 9 л. Фракции, содержащие 8-оксоаденозин-2'- и 3'-фосфат (контроль по УФ-поглощению при 260 нм), нейтрализовали до рН 7,5 раствором LiOH, упаривали в вакууме досуха, добавляли 100 мл спирта, упаривали досуха, Li-соли нуклеотидов промывали спиртом. Растворы солей нуклеотидов наносили на колонку с дауэксом-50 (H<sup>+</sup>-форма), промывали водой; фракции, содержащие нуклеотиды, нейтрализовали до рН 7,5 раствором NaOH, упаривали до малого объема и лиофилизировали. Получали 80 мг динатриевой соли 8-оксоаденозин-3'-фосфата (IIIa) и 50 мг динатриевой соли 8-оксоаденозин-2'-фосфата (IIIб).

*8-Тиаденозин-3'- и 2'-фосфат (IVa) и (IVб).* В раствор 115 мг (0,25 ммоль) аммониевой соли 8-бромаденозин-3'-фосфата (IIa) в 2 мл смеси диметилформамид — вода (1:1 по объему) добавляли 0,2 мл 40% водного раствора NaSH и оставляли на 2 сут при 20°. Раствор нейтрализовали 0,1 н. HCl до рН 7, фильтровали и наносили на колонку с DEAE-целлюлозой (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-форма, 300 мл), промывали водой и элюировали NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> (линейный градиент от 0,01 до 0,2 М NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>, объем 6 л). Фракции, содержащие 8-тиааденозин-2'- (IVб) и 3'-фосфат (IVa), упаривали в вакууме досуха,

растворяли в 20 мл воды, упаривали и эту операцию повторяли еще 4 раза. Остаток растворяли в 20 мл воды и лиофилизировали. Выход аммониевой соли 8-тиоаденозин-2'-фосфата (IVб) 40 мг. Для дальнейшей очистки растворы нуклеотидов пропускали через колонку с дауэксом-50 ( $\text{NH}_4^+$ -форма), элюировали водой.

**Фосфорилирование формицина.** Раствор 200 мг (0,8 ммоль) формицина и 3,28 г (8 ммоль) три(тетраметиламмониевой соли) триметафосфата (раствор триметафосфата натрия пропускали через колонку с дауэксом-50 ( $(\text{CH}_3)_4\text{N}^+$ -форма), упаривали, лиофилизировали) в 8 мл 1 М NaOH оставляли на 5 сут ( $20^\circ$ ). Реакционную смесь фильтровали, кристаллы промывали водой, к фильтрату добавляли дауэкс-50 (пиридиновая форма) до pH 7, смолу отфильтровывали, промывали 5% водным пиридином. Раствор наносили на колонку с DEAE-целлюлозой ( $\text{HCO}_3^-$ -форма, 500 мл), водой элюировали фракцию с исходным формицином, который очищали упариванием и пропусканием водного раствора через колонку с дауэксом-50 ( $\text{H}^+$ -форма, элюирование 2,5% раствором аммиака). Получали 100 мг формицина. После промывания водой колонку с DEAE-целлюлозой элюировали  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  (линейный градиент от 0,05 до 0,25 М  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , объем 9 л). Фракции, содержащие смесь 2' (3')-фосфата формицина (элюирующая концентрации  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  0,125 М, контроль по УФ-поглощению при 260 нм), объединяли, упаривали в вакууме досуха, растворяли в 10 мл воды, упаривали и эту операцию повторяли еще 5 раз. Остаток растворяли в 30 мл воды и лиофилизировали. Продукт растворяли в 250 мл воды и пропускали через колонку с дауэксом-50 ( $\text{H}^+$ -форма, 100 мл), промывали водой до нейтрального pH, затем элюировали 2,5% раствором аммиака. Аммиачные фракции, содержащие нуклеотиды, упаривали в вакууме до 50 мл и наносили на колонку с дауэксом-1 ( $\text{HCOO}^-$ -форма,  $1 \times 25$  см), промывали водой, затем 0,09 н.  $\text{HCOOH}$ . Собирали фракции, содержащие формицин-3'- и 2'-фосфат, упаривали в вакууме, упаривали с водой, лиофилизировали. Выход формицин-2'-фосфата (VIб) 50 мг (34% в расчете на прореагировавший формицин), формицин-3'-фосфата (VIa) 42 мг (29%).

**Приготовление образцов и снятие спектров ПМР.** В работе использовались хроматографически чистые образцы рибонуклеазы А. Препарат рибонуклеазы А для замены подвижных протонов на дейтерий выдерживали в растворе  $\text{D}_2\text{O}$  (99,8%) при концентрации 0,5%, рD 7 и  $30^\circ$  в течение 2 сут, а затем лиофильно высушивали. Активность дейтерированного препарата рибонуклеазы А была не менее 95% по отношению к исходному при ферментативном гидролизе уридин-2', 3'-циклофосфата. Образцы для анализа методом ПМР готовились в виде 0,01 М растворов в  $\text{D}_2\text{O}$  с ионной силой 0,25 М (0,2 М NaCl и 0,05 М  $\text{CH}_3\text{COONa}$ ). Значение рD создавалось добавлением DCl или NaOD. Измерение рD проводилось на рН-метре РНМ 64 (Radiometer, Дания) специально изготовленными микроэлектродами непосредственно в ампулах с образцами. В экспериментах по изучению зависимости химических сдвигов протонов белка от концентрации нуклеотида образец рибонуклеазы эвакуировался после снятия спектра ПМР из ампул в микрокувету, где производилось смешивание с определенной навеской нуклеотида. Затем образец вновь переносился в ампулу, где снова измерялось значение рD и в случае необходимости проводилась его коррекция до рD 5,8. Наибольшая концентрация нуклеотида составляла 0,1 М, т. е. превышала концентрацию белка в 10 раз. Спектры ПМР измерялись на приборе XL-100-15 Varian (США), в режиме фурье-преобразования при  $32^\circ$ . Стабилизация резонансных условий осуществлялась по сигналу растворителя. Для уменьшения интенсивности сигнала протонов от НОД, присутствующего в растворителе, использовалось селективное стационарное насыщение этого сигнала. Химические сдвиги измерялись относительно гексаметилдисилоксана, использовавшегося как внешний эталон. Определение положения сигналов протонов  $\text{Tur}^{25}$  проводилось по разностным спектрам ПМР, записанным в присутствии и в отсут-



ствии нуклеотида. Изменения химических сдвигов этих протонов могли быть зарегистрированы, если они превышали 0,05 м. д. Методика разностных спектров использовалась в тех же целях при ПМР-титровании комплекса рибонуклеазы А с 8-оксоаденозин-3'-фосфатом (IIIa).

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Richards F. M., Wyckoff H. W. (1971) *The Enzymes*, 3rd edn. Boyer P., ed., vol. 4, pp. 647—806, Acad. Press, N. Y.
2. Richards F. M., Wyckoff H. W. (1973) *Atlas of Molecular Structures in Biology* (Phillips D. C., Richards F. M., eds.), vol. 1, Clarendon Press, Oxford.
3. Richards F. M., Wyckoff H. W., Allewel N. (1970) in: *The Neurosciences: Second Programme* (Schmitt T. O., ed.), pp. 901—912, Rockefeller Press, N. Y.
4. Аврамова З. В., Дудкин С. М., Карабашян Л. В. (1974) *Молекулярн. биология*, 8, 501—506.
5. Ikehara M., Uesugi S. (1960) *Chem. and Pharm. Bull.*, 17, 348—354.
6. Ikehara M., Tazawa I., Fukui T. (1969) *Chem. and Pharm. Bull.*, 17, 1019—1024.
7. Ikehara M., Ohtsuka E., Uesugi S. (1973) *Chem. and Pharm. Bull.*, 21, 444—450.
8. Ikehara M., Nagura T., Ohtsuka E. (1975) *Nucleic Acids Res.*, 2, 1345—1363.
9. Saffhil R. (1970) *J. Org. Chem.*, 35, 2881—2883.
10. Westhof E., Roder O., Croneis I., Ludemann H. D. (1975) *Z. Naturforsch.*, 30c, 131—140.
11. Mason S. F. (1957) *Ciba Found. Simp. Chem. Biol. Purines*, p. 60.
12. Ikehara M., Kaneka M., Nakahara Y., Yamada S., Uesugi S. (1971) *Chem. and Pharm. Bull.*, 19, 1381—1388.
13. Ikehara M., Taba H., Kaneko M. (1968) *Tetrahedron*, 24, 3489—3498.
14. Altona C., Sundaralingam M. (1973) *J. Amer. Chem. Soc.*, 95, 2333—2344.
15. Evans F. E., Sarma R. N. (1974) *J. Biol. Chem.*, 249, 4754—4759.
16. Sarma R. N., Lee C. H., Evans F. E., Yathindra N., Sundaralingam M. (1974) *J. Amer. Chem. Soc.*, 96, 7337—7348.
17. Ludemann H. D., Roder O., Westhof E. (1974) *Eur. J. Biochem.*, 143—150.
18. Ikehara M., Uesugi S., Yoshida K. (1972) *Biochemistry*, 11, 830—836.
19. Meadows D. H., Roberts G. C. K., Jardetzky O. (1969) *J. Mol. Biol.*, 45, 491—511.
20. Haar W., Maurear W., Ruterjans U. (1974) *Eur. J. Biochem.*, 44, 201—202.
21. Krackov M. N., Lee C. M., Mautner H. G. (1965) *J. Amer. Chem. Soc.*, 87, 892—895.
22. Карпейский М. Я. (1976) *Молекулярн. биология*, 10, 1197—1210.

Поступила в редакцию  
19.VI.1978

#### ON THE INTERACTION OF PYRIMIDINE SPECIFIC RIBONUCLEASE A WITH PURINE NUCLEOTIDES

ANTONOV I. V., KARPEISKY M. Ya., PADYUKOVA N. Sh.,  
YAKOVLEV G. I., SAKHAROVSKY V. G.

*Institute of Molecular Biology, Academy of Sciences of the USSR,  
Moscow; Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms,  
Academy of Sciences of the USSR, Pushchino*

To shed light onto molecular basis of ribonuclease A pyrimidine specificity, the synthesis of 8-bromo-3'-AMP, 8-thio-3'-AMP, 8-oxo-3'-AMP, and formycin-3'-phosphate was carried out. It was found that with all above compounds the *syn* conformer was predominant in the conformational equilibrium characteristic of mutual disposition of the base and ribose. The NMR technique was used to study the interaction of the enzyme with the 3'-AMP analogs, of which only 8-oxo-3'-AMP was found to bind at the pyrimidine specific site of RNAase A. This finding implies that the carbonyl group in position «2» and the nitrogen atom in position «3» of a nucleic base are essential for nucleotide binding at this site. The results obtained allow to rationalize substrate specificity of the enzyme in terms of certain possible contacts between the fragment of substrate nucleic base and the electronically complementary protein groups, rather than exact topological fit between the enzyme and a substrate.