

С. М. ДУДКИН, М. Я. КАРПЕЙСКИЙ, В. Г. САХАРОВСКИЙ,
Г. И. ЯКОВЛЕВ

О КОНФОРМАЦИИ АКТИВНОГО ЦЕНТРА РИБОНУКЛЕАЗЫ А В РАСТВОРЕ

(Представлено академиком А. Е. Браунштейном 25 XII 1974)

Вопрос о том, можно ли использовать данные рентгеноструктурного анализа кристаллов ферментов при изучении механизма и специфичности ферментативных реакций является одним из наиболее актуальных вопросов современной энзимологии. Ответ на него в каждом конкретном случае связан с тем, насколько точно можно определить положение отдельных функциональных групп активного центра в водном растворе фермента, используя комплекс физико-химических методов.

Настоящее сообщение посвящено изучению конформации гистидиновых остатков активного центра рибонуклеазы А (РНКаза А) в растворе. В молекуле фермента имеется четыре остатка гистидинов в положениях 12, 48, 105 и 119. По данным рентгеноструктурного анализа кристаллов РНКаза S (полностью активного производного РНКаза А, в которой пептидная связь между Ала-20 и Сер-21 расщеплена субтилизином) гис-12 и гис-48 практически недоступны растворителю, тогда как гис-119 и гис-105 расположены на поверхности белковой глобулы (¹). Из работ по химической модификации (²) и рентгеноструктурному анализу (³) следует, что гис-48 и гис-105 находятся на периферии молекулы, а гис-12 и гис-119 входят в активный центр фермента.

Изучена (⁴) кинетика дейтерообмена при С-2 атоме имидазольного цикла остатков гистидинов РНКаза А методом протонного магнитного резонанса (п.м.р.). Оказалось, что скорость дейтерообмена С-2 Н гис-48 и гис-105, которая определяется их доступностью растворителю, полностью соответствует локализации этих остатков в третичной структуре РНКаза S в кристалле. Для остатков гистидинов активного центра было показано, что С-2 Н гис-12 обменивается на дейтерий со значительно большей скоростью, чем С-2 Н гис-119. Этот результат не согласуется с тем фактом, что в кристалле имидазольный цикл гис-119 экспонирован и обладает большой подвижностью, в то время как имидазольный цикл гис-12 погружен в молекулу белка (¹). Можно думать, что такое расхождение вызвано либо изменением конформации остатка гис-12 и (или) гис-119 при переходе фермента из раствора в кристаллическое состояние, либо ошибкой в отнесении сигналов С-2 Н гис-12 и гис-119 в спектре п.м.р. РНКаза А.

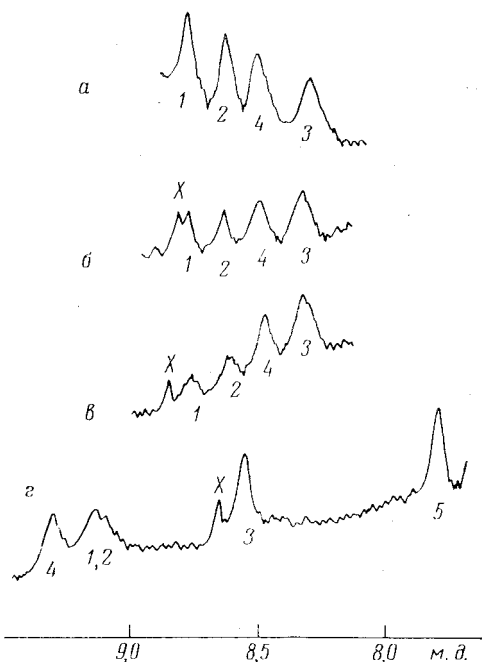
Поскольку оба гистидина входят в активный центр, то очевидно, что никакие заключения относительно стереохимии комплексов РНКаза А с субстратами и механизма ее действия не могут быть признаны убедительными без решения этого вопроса. В связи с этим мы повторили эксперименты по дейтерообмену (⁴) и отнесению сигналов С-2 Н в спектре п.м.р. РНКаза А (⁵) на тщательно очищенных препаратах РНКаза А и РНКаза S.

РНКаза А, РНКаза S, S-пептид (пептид, включающий аминокислотные остатки 1—20), S-белок (полипептид, включающий аминокислотные остатки 20—124) и цитидин-3'-фосфат (3'-ЦМФ) получали аналогично работе (⁶). Спектры п.м.р. снимали на спектрометре НА-100 D с использованием накопителя С 1024 («Varian»). В качестве эталонного сигнала ис-

пользовали сигнал НОД. На спектрах и графиках химические сдвиги приведены относительно сигнала внешнего эталона гексаметилдисилоксана (ГМДС). При 32° в области рН 3—9 $\delta_{(\text{ГМДС})}$ м.д. = $\delta_{(\text{НОД})}$ м.д. + 5 м.д. Титрование растворов белков проводили как описано ранее в работе (7).

В соответствии с литературными данными в слабополюльной части спектра п.м.р. РНКазы А видны пять однопротонных сигналов, которые согласно работе Медоуз и др. (5) принято относить к С-2 Н гис-105 (1), гис-12 (2),

Рис. 1. Дейтерообмен РНКазы А ($5 \cdot 10^{-3} M$) при рН 8,5 и 32° . а — спектр п.м.р. РНКазы А в D_2O в области поглощения С-2 Н гистидинов, полученный при рН 6,5 в $0,2 M CH_3COONa$. Количество прохождений от 50 до 100; б — спектр, полученный в тех же условиях, после 5 суток обмена; в — спектр, полученный в условиях аналогичных (а), после 10 суток обмена; г — спектр п.м.р. РНКазы А после 10 суток обмена, полученный при рН 3,6. Интегральные интенсивности сигналов С-2 Н после 10 суток обмена для рН 6,5 составляют 0,3; 0,4; 1,0; 0,8 протона для сигналов 1, 2, 3 и 4 соответственно. X — неидентифицированный сигнал



гис-48 (3), гис-119 (4) и С-4 Н гис-105 (5) (рис. 1). При выдерживании РНКазы А в D_2O при рН 8,0 в течение 5—10 суток атом водорода при С-2 имидазольного цикла обменивается на дейтерий и интенсивность соответствующего сигнала в спектре п.м.р. РНКазы А уменьшается. Как видно из рис. 1 с наибольшей скоростью убывает интенсивность сигналов 1 и 2, что согласуется с данными (4). Константы скорости обмена этих протонов, определенные по сравнению интенсивности сигналов С-2 Н с интенсивностью сигнала С-4 Н гис-105, равны $0,14 \pm 0,01$ (1) и $0,10 \pm 0,01$ (2) суток $^{-1}$.

Для того, чтобы установить действительно ли сигнал 2 относится к гис-12 мы повторили эксперименты Медоуз и др. (5), на основе которых было сделано это отнесение. Обработкой субтилизином РНКазы А получена РНКазы S, разделенная затем на S-белок и S-пептид. S-пептид (рис. 2а) в течение 10 суток подвергался дейтерообмену при рН 8,5 и 32° . Из рис. 2б видно, что за это время С-2 Н гис-12 практически полностью обменялся на дейтерий (константа скорости обмена равна $0,22 \pm 0,02$ суток $^{-1}$). В отличие от литературных данных мы не наблюдали уширения сигнала С-2 Н S-пептида при щелочных значениях рН (4, 5). В области рН 3—9 ширина сигнала составляла ≈ 4 гц. Реконструкцию РНКазы S проводили в $0,2 M$ растворе NaCl в D_2O при рН 6,0, добавляя к раствору S-белка (рис. 2в) эквимолярные количества S-пептида или дейтерированного S-пептида. Спектры РНКазы S, реконструированной из S-пептида и S-белка (РНКазы S'), и РНКазы А в интервале рН 3,5—6,5 практически идентичны (рис. 3а). Этот результат согласуется с недавно опубликованными данными (8) и противоречит данным (5). В то же время сигналы С-2 протонов гистидинов в спектре РНКазы S' шире, чем соответствующие

сигналы в спектре РНКазы А, и в интервале рН 6,5–7,5 перекрываются, что не дает возможности непосредственно проследить ход кривых титрования в щелочности. В спектре РНКазы S, реконструированной из дейтерированного S-пептида и S-белка (РНКазы S^D), при рН 6,0 присутствует сигнал 2 (рис. 2*б*) и уменьшается (по сравнению с РНКазой S') в два раза интенсивность пика, соответствующего сумме сигналов 3 и 4.

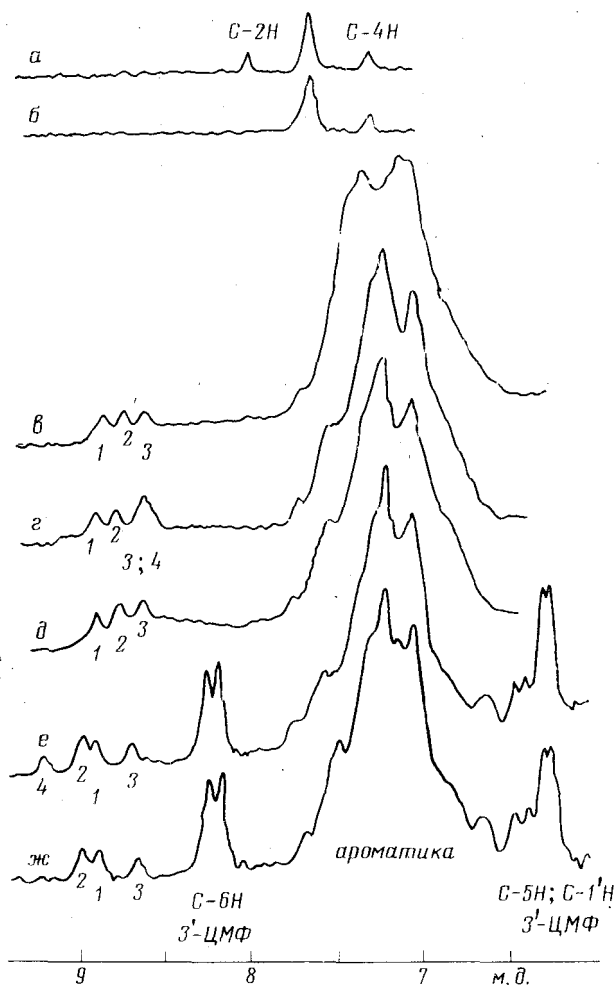


Рис. 2. Ароматическая область спектров п.м.р.: *а* — S-пептида (рD 8,5), *б* — S-пептида после дейтерообмена в течение 10 суток при рD 8,5 и 32°, *в* — S-белка (рD 6,0), *г* — РНКазы S' (рD 6,0), *д* — РНКазы S^D (рD 6,0), *е* — комплекса РНКазы S' с 3'-ЦМФ (рD 6,0, соотношение 1:3), *ж* — комплекса РНКазы S^D с 3'-ЦМФ (рD 6,0, соотношение 1:3). Концентрация белков и S-пептида $4 \cdot 10^{-3}$ M, D₂O, 0,2 M NaCl, 50–100 проходов

Следовательно один из этих сигналов в спектре РНКазы S' принадлежал гис-12. Поскольку отнесение сигнала 1 к гис-105, а сигнала 3 к гис-48 не вызывает сомнений, то сигнал 2 должен принадлежать гис-119.

На рис. 3*б* приведена зависимость химических сдвигов C-2 H трех гистидиновых сигналов РНКазы S^D от рН (гис-48, гис-105 и гис-119). Сопоставление кривых титрования на рис. 3 показывает, что при всех исследованных значениях рН в спектре РНКазы S^D отсутствует сигнал 4. Таким образом, из проведенного эксперимента следует, что сигнал 4 отнесется к C-2 H гис-12, а не гис-119.

Для окончательного подтверждения правильности сделанного вывода мы изучили спектры п.м.р. комплексов РНКазы S' и РНКазы S^D с 3'-ЦМФ (рис. 2е, ж). Согласно работе (9) в спектре п.м.р. комплекса РНКазы А с 3'-ЦМФ по сравнению со спектром п.м.р. РНКазы А максимально изменяется положение сигнала С-2 Н гис-119, который при всех исследованных значениях рН находится в самом слабом поле. Аналогичный эффект

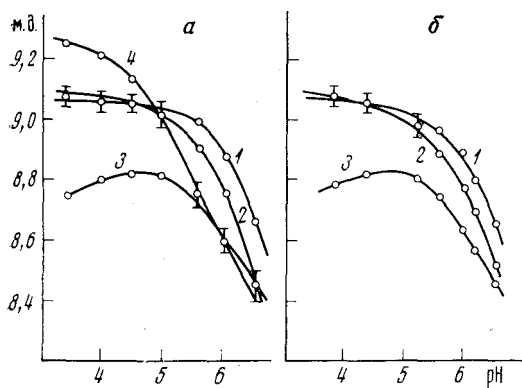


Рис. 3

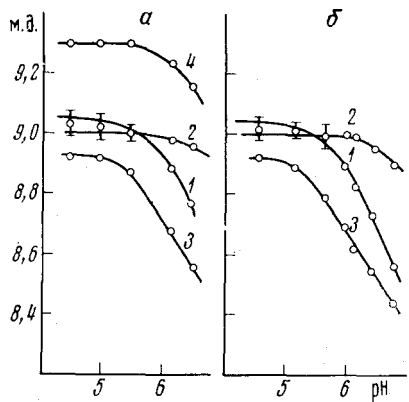


Рис. 4

Рис. 3. Кривые титрования гистидиновых остатков РНКазы S' (а) и РНКазы S^D (б), полученные из изменения величины химических сдвигов С-2 Н от рН. Условия как на рис. 2. Здесь и на рис. 4 1—4 — то же, что и на рис. 1

Рис. 4. Кривые титрования гистидиновых остатков комплексов РНКазы S' (а) и РНКазы S^D (б) с 3'-ЦМФ (соотношение 1:4), полученные аналогично рис. 3

наблюдается и в случае РНКазы S' (рис. 2е). На рис. 4 приведены кривые титрования комплексов РНКазы (S') (а) и РНКазы S^D (б), с 3'-ЦМФ. Видно, что в спектрах комплекса РНКазы S^D , полученных при различных значениях рН, отсутствует наиболее слабопольный сигнал, соответствующий сигналу 4 в спектрах комплекса РНКазы S' .

Таким образом, представленные экспериментальные результаты однозначно говорят о том, что принятое в настоящее время на основе работы (5) отнесение сигналов 2 и 4 к остаткам гис-12 и гис-119, соответственно должно быть изменено на противоположное. Следовательно, соотношение скоростей дейтерообмена С-2 Н остатков гис-12 и гис-119 в растворе подтверждает ту точку зрения, что конформация активного центра фермента в растворе и в кристалле аналогична.

Сделанные выводы особенно важны для правильной интерпретации результатов, полученных ранее при исследовании методом я.м.р. строения комплексов РНКазы А с нуклеотидами (10). Детальному анализу структуры этих комплексов в свете данных, полученных в настоящей работе, будут посвящены последующие сообщения.

Институт молекулярной биологии
Академии наук СССР
Москва

Поступило
13 XII 1974

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов
Академии наук СССР
Пушино-на-Оке

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ F. M. Richards, H. W. Wyckoff, *The Enzymes*, v. 4, 647 (1971). ² A. M. Crestfield, W. H. Stein, S. Moore, *J. Biol. Chem.*, v. 238, 2443 (1963). ³ H. W. Wyckoff, D. Tsernoglou et al., *J. Biol. Chem.* v. 245, 305 (1970). ⁴ J. H. Bradbury, B. E. Chapman, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 49, 851 (1972). ⁵ D. H. Meadows, O. Jardetzky et al., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, v. 60, 766 (1968). ⁶ М. Я. Карпейский, С. М. Дудкин и др., *Сб.: Структура и функции активных центров ферментов*, М., 1974, стр. 183. ⁷ V. G. Sacharovskiy, I. I. Chervin et al., *FEBS Letters*, v. 33, 323 (1973). ⁸ I. S. Cohen, J. H. Griffin, A. N. Schechter, *J. Biol. Chem.*, v. 248, 4305 (1973). ⁹ D. H. Meadows, O. Jardetzky, *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, v. 61, 406 (1968). ¹⁰ D. H. Meadows, G. C. K. Roberts, O. Jardetzky, *J. Mol. Biol.*, v. 45, 491 (1969).