



УДК 577.152.314*9.088

© 1990 г.

Г. Е. Банникова, Е. В. Благова *, В. П. Варламов,
Е. Ю. Моргунова *, А. А. Дементьев **, С. В. Шляпников **

РАЗДЕЛЕНИЕ ИЗОФОРМ И КРИСТАЛЛИЗАЦИЯ ЭНДОНУКЛЕАЗЫ *SERRATIA MARCESCENS*

Инженерный центр «Биоинженерия» при Институте молекулярной биологии им.
В. А. Энгельгардта АН СССР, Москва;

* Институт кристаллографии АН СССР, Москва;

** Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта АН СССР, Москва

Внеклеточная эндонуклеаза *Serratia marcescens* (нуклеаза *Sm*, КФ 3.1.4.9) расщепляет ДНК, РНК, а также соответствующие одно- и двухнитевые гомополимеры с образованием 5'-фосфорилированных олигонуклеотидов и, согласно последним данным, обладает противоопухолевой и противовирусной активностью [1]. В настоящее время из разных штаммов бактерий получены препараты нуклеазы, различающиеся по ряду характеристик и физико-химических свойств [2—6]. В СССР первые исследования эндонуклеазы *Sm* инициированы выделением высокоочищенного препарата белка, секретируемого штаммом Вu211 ATCC 9986 [4], а позднее его беспигментным вариантом — штаммом 24 [5].

В настоящей работе приведены результаты исследования эндонуклеазы *Sm* штамма В10 М1, отличающегося от других источников более высокой продуктивностью [7].

Препарат эндонуклеазы *Sm* выделяли из фильтрата культуральной среды *S. marcescens* В10 М1 с использованием описанной ранее двухстадийной процедуры очистки, в основе которой лежит применение лигандообменной хроматографии на иминодиацетат-агарозе в Cu^{2+} -форме с последующим концентрированием белка на фосфоцеллюлозе [8]. Полученная таким образом эндонуклеаза *Sm* ($3-5 \cdot 10^6$ ед. акт./мг [5]) была свободна от фосфатазной, фосфомоно- и фосфодиэстеразной активности и, согласно данным электрофореза в ПААГ в денатурирующих условиях, не содержала посторонних белковых примесей (рис. 1, 3). Вместе с тем анализ в препарате N-концевых остатков аминокислот дансильным методом, в результате которого детектируются остатки Glu и Asp, а также данные электрофореза в ПААГ в отсутствие денатурантов (рис. 1, 4) и обнаружение в препарате при изоэлектрофокусировании двух энзиматически активных белковых компонентов с pI 7,1 и 6,7 свидетельствовало о гетерогенности исходной нуклеазы.

При ионообменной хроматографии на DEAE-Toyopearl 650S (рис. 2) эндонуклеаза *Sm* разделяется на две электрофоретически гомогенные субфракции (нуклеазы Sm_1 и Sm_2 , рис. 1, 5, 6), соответствующие по изоэлектрическим точкам и N-концевым остаткам аминокислот компонентам исходного белка и отличающиеся от него по удельной активности. Выход продуктов составлял 7 и 54% соответственно.

Сравнение аминокислотных составов нуклеаз Sm_1 и Sm_2 (данные не приведены) выявляет их значительное структурное сходство между собой, а также с аминокислотными составами эндонуклеаз *Sm* штаммов 24 и W225 [5, 6]. Для всех них наблюдается близкое содержание Thr, Ser, Glx, Ala, Val, Met, Ile, Leu, Tyr, Phe, Trp, His, Lys и Arg.

Результаты автоматической эдмановской деградации [9] нуклеазы Sm_1

Сокращения: SDS — додецилсульфат натрия.

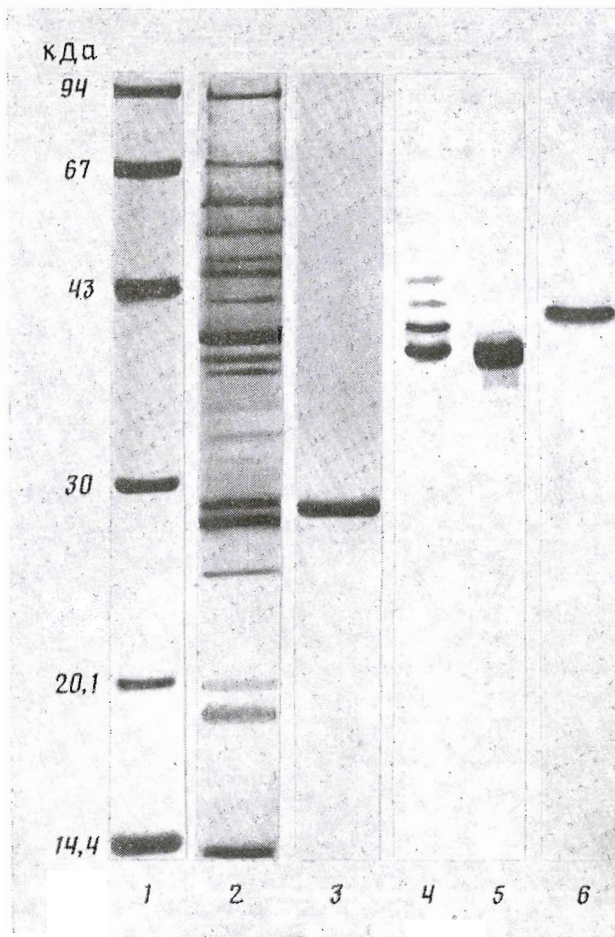


Рис. 1. Электрофорез в ПААГ препаратов нуклеаз *Sm* в присутствии SDS (1—3) и без денатурантов (4—6): 1 — маркерные белки; 2 — фильтрат культуральной среды *S. marcescens*; 3, 4 — препарат нуклеазы *Sm* после хроматографии на фосфоцеллюлозе; 5 — нуклеаза *Sm*₂; 6 — нуклеаза *Sm*₁

(E-S-I-D-N-C-A-V-G-C-P-T-G-G-S-S?-N-V-S-I-V-R-H-A-Y-T-L-) и нуклеазы *Sm*₂ (D-T-I-E-S-I-D-N-C-A-V-) показывают, что N-концевые аминокислотные последовательности двух белков различаются наличием в нуклеазе *Sm*₂ дополнительного трипептидного сегмента (подчеркнут). Аминокислотная последовательность 27 остатков нуклеазы *Sm*₁ совпадает со структурой N-концевой части (остатки 4—30) нуклеазы *Sm* штамма W225 и соответствующего фрагмента нуклеазы *Sm* штамма SM6 [10]. Подобно нуклеазе *Sm*₂ две последние эндонуклеазы дополнительно содержат в N-концевой части трипептидный сегмент Asp-Thr-Leu.

Сходство структур нуклеазы *Sm*₁ и нуклеаз штаммов W225 и SM6 подтверждается также при исследовании аминокислотной последовательности бромциановых фрагментов остаточного продукта секвенирования нуклеазы *Sm*₁, предварительно подвергнутой 27 циклам эдмановской деградации. Эндонуклеаза *Sm*₁ содержит два остатка Met (Met¹⁵⁴ и Met²⁴¹ по нумерации в структуре нуклеазы *Sm* штамма W225 [6]), и, поскольку секвенирование N-концевого участка молекулы исчерпано при проведении эдмановской деградации интактного белка, в ходе деградации по Эдману нефракционированного BrCN-гидролизата остаточного продукта секвенирования прослеживается аминокислотная последовательность одновременно двух фрагментов нуклеазы. Результаты секвенирования (G-(K, C)-(L, K)-(P, N?)-G-T-Q-K-A-H-T-I-P-S-A-Y-?-K-V-I-) полностью соответствуют структуре сегментов полипептидной цепи нуклеазы *Sm* штам-

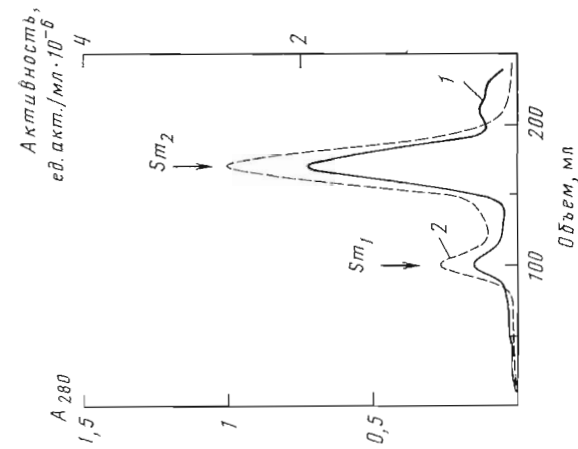


Рис. 2

Рис. 2. Фракционирование эндонуклеазы *Sm* на колонке ($1,0 \times 4,8$ см) с DEAE-Торорсаг 650S₁ (элюция градиентом 0—0,2 М NaCl в 10 мМ трис-НСI-буфере (рН 8,3), 42 мл/ч; нагрузка $7 \cdot 10^7$ ед. акт. нуклеазы *Sm*). 1 — A_{280} ; 2 — активность

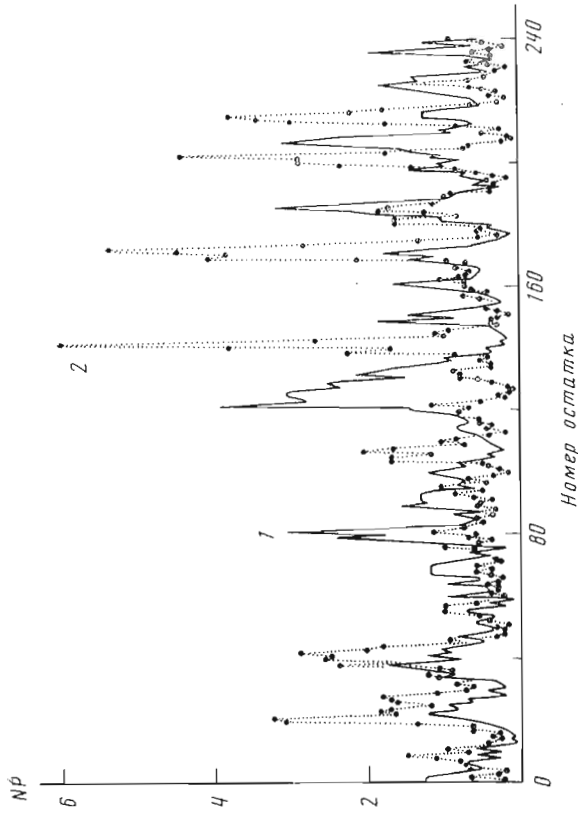


Рис. 3

Рис. 3. Расчет вторичной структуры нуклеазы *Sm* штамма W225. NR — произведение α -спиральных (1) и β -структурных (2) конформационных потенциалов в текса- и пентапептидных локусах цепи белка

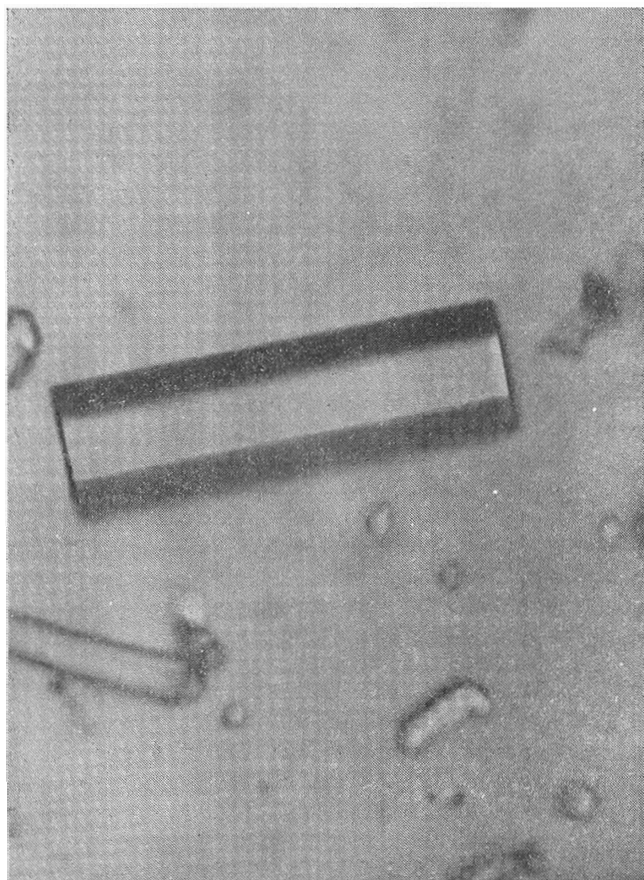


Рис. 4. Кристалл нуклеазы Sm_2 ($\times 400$)

ма W225 (остатки 155—174 и 242—245), непосредственно примыкающих к остаткам Met.

Таким образом, нуклеазы Sm_1 и Sm_2 штамма B10 M1 представляют собой две изоформы фермента, близкие по структуре нуклеазам Sm штаммов W225 и SM6. Наличие в структуре нуклеазы Sm_2 N-концевого трипептидного сегмента, содержащего остаток дикарбоновой кислоты, может объяснить появление двух изоформ фермента, различающихся хроматографическими свойствами и значениями изоэлектрических точек, хотя последние могут быть обусловлены и другими изменениями в структуре белков или различиями в их конформациях.

Высокий уровень сходства структур, а возможно, и идентичность полных аминокислотных последовательностей нуклеаз Sm штаммов W225 и SM6 и нуклеазы Sm_2 , позволяет предсказать распределение элементов вторичной структуры изоформы нуклеазы Sm_2 методом Чоу и Фасмана в модификации Дуфтона и Хайдера [11] по известной аминокислотной последовательности гомологичных нуклеаз (рис. 3).

Согласно данным расчета, нуклеазы Sm являются α/β -белками, содержащими один расположенный в середине молекулы протяженный (остатки 120—136) и три более коротких (остатки 78—84, 181—190 и 202—212) участка α -спиралей, разделенных по ходу полипептидной цепи шестью элементами β -структурных конформаций (остатки 19—39, 34—35, 139—146, 168—176, 199—204 и 213—219).

Выделение индивидуальных изоформ эндонуклеазы Sm позволило провести поиск условий кристаллизации и получить высокоупорядоченные кристаллы белка, пригодные для рентгеноструктурного анализа.

Кристаллы изоформы нуклеазы Sm_2 выращивали методом диффузии паров растворителя в капле или при равновесном диализе 1—3,5% рас-

твора белка в 10 мМ трис-НСI-буфере, рН 8,3, в микродиффузионных ячейках, используя в качестве осадителя 1,2—1,6 М сульфат аммония. Фермент кристаллизуется в форме удлиненных (1 : 4) призм, достигающих в течение 2 мес максимальных размеров — $0,7 \times 0,3 \times 0,15$ мм (рис. 4).

Кристаллы содержат две молекулы белка в независимой части ячейки и принадлежат к пространственной группе $P2_12_12_1$ с параметрами элементарной ячейки $a = 69,0$, $b = 106,7$, $c = 74,8$ Å. Плотность упаковки характеризуется значением параметра Метьюза, равным 2,3. Кристаллы дифрагируют в области до $1,6 \text{ \AA}^{-1}$ при угловой ширине рефлекса $0,28$ град.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Куриненко Б. М., Беляева М. И., Черепнева И. У., Виестуре Э. А. // *Вопросы онкологии*. 1977. Т. 23. № 11. С. 94—98.
2. Nestle M., Roberts W. K. // *J. Biol. Chem.* 1969. V. 244. № 19. P. 5213—5218.
3. Yonemura K., Matsumoto K., Maeda H. // *J. Biochem.* 1983. V. 93. № 5. P. 1287—1295.
4. Лещинская И. Б., Балаган Н. П., Егорова Г. С., Таняшин В. И., Третьяк Т. М. // *Биохимия*. 1974. Т. 39. № 1. С. 116—122.
5. Филимонова М. Н., Баратова Л. А., Воспелникова Н. Д., Желтова А. О. // *Биохимия*. 1981. Т. 46. № 9. С. 1660—1665.
6. Biedermann K., Jepsen P. K., Riise E., Svendsen I. B. // *Carlsberg Res. Commun.* 1989. V. 54. № 1. P. 17—27.
7. Яснова Л. Н., Пучкова Л. И. // *Микробиология*. 1976. Т. 45. № 6. С. 976—983.
8. Varlamov V. P., Lopatin S. A., Vannikova G. E. // *Proc. of the First Intern. Meeting «Structure and Chemistry of Ribonucleases»*. М., 1989. P. 383—391.
9. Шляпников С. В., Безбородова С. И., Куликов В. А., Яковлев Г. И. // *Биоорганическая химия*. 1986. Т. 12. № 2. С. 172—184.
10. Ball T. K., Saurugger P. N., Benedik M. J. // *Gene*. 1987. V. 57. № 2—3. P. 183—192.
11. Dufton H. J., Hider R. C. // *J. Mol. Biol.* 1977. V. 115. № 2. P. 117—193.

Поступило в редакцию
20.IV.1990

G. E. BANNIKOVA, E. V. BLAGOVA *, V. P. VARLAMOV, E. Yu. MORGUNOVA *,
A. A. DEMENTIEV **, S. V. SHLYAPNIKOV **

SEPARATION OF ISOFORMS OF A *SERRATIA MARCESCENS* ENDONUCLEASE AND CRISTALLIZATION OF THE ENZYME

V. A. Engelhardt Institute of Molecular Biology Bioengineering Centre, Moscow;

* Institute of Crystallography, Academy of Sciences of the USSR, Moscow;

** V. A. Engelhardt Institute of Molecular Biology, Academy
of Sciences of the USSR, Moscow

Two isoforms of an extracellular endonuclease, nuclease Sm_1 and nuclease Sm_2 , were isolated from the culture filtrate of *Serratia marcescens* strain B10 M1 by the ligand-exchange chromatography on iminodiacetate-agarose in Cu^{2+} -form, and chromatography on phosphocellulose and DEAE-Toyopearl 650S. The pI for nucleases Sm_1 and Sm_2 were found to be 7,1 and 6,7, respectively. The amino acid analysis and N-terminal amino acid sequencing of the proteins showed a significant degree of homology between the enzymes. The secondary structure of nuclease Sm_2 was calculated. Crystals of nuclease Sm_2 were obtained with the space group $P2_12_12_1$, a 69,0; b 106,7; c 74,8 Å.