

УДК 577.152.3

**ВЛИЯНИЕ МОНОНУКЛЕОТИДОВ НА РНКАЗНУЮ
И ДНКАЗНУЮ АКТИВНОСТИ НУКЛЕАЗЫ *SERRATIA
MARCESCENS* ПРИ ОПТИМАЛЬНОЙ КОНЦЕНТРАЦИИ
КАТИОНОВ МАГНИЯ**

Ю.Д. Шабаета, И.В. Игнатъева, М.Н. Филимонова

Аннотация

В условиях оптимального соотношения Mg^{2+} /фосфор_{субстрата} исследовано влияние нуклеотидов на ДНКазную и РНКазную активности эндонуклеазы бактерий *Serratia marcescens*. Показано, что независимо от количества фосфатов, типа азотистого основания и углеводного остатка все исследованные нуклеотиды, добавленные в эквимольном к концентрации субстрата количестве, вызывали достоверное снижение РНКазной активности и не влияли на ДНКазную активность эндонуклеазы.

Введение

Эндонуклеаза бактерий *Serratia marcescens* (Sma nuc) – фермент с известной структурой [1, 2] и механизмом действия [3]. Sma nuc применяют на практике в качестве противовирусного препарата [4–6]. Выделены и охарактеризованы молекулярные формы фермента [7–11]. Подробно изучены многие физико-химические и биохимические свойства эндонуклеазы [12–15], в том числе механизм активации Sma nuc Mg^{2+} [10].

Согласно этому механизму, активность фермента изменяется в результате образования комплекса Mg^{2+} с ДНК [10]. Вступая в реакцию комплексообразования с молекулами ДНК, о чем свидетельствовали спектры кругового дихроизма, катионы Mg вызывали изменение вторичной структуры субстрата. Именно это влияло на активность эндонуклеазы, проявляющей чувствительность ко вторичной структуре субстрата [9, 10].

Установлено, что критическую роль в проявлении активности Sma nuc играет не столько концентрация Mg^{2+} в окружающей среде, сколько соотношение Mg^{2+} /фосфор_{субстрата}. Показано, что оптимальным для проявления активности Sma nuc является соотношение Mg^{2+} /фосфор_{субстрата}, равное 20 : 1 [10]. При соотношении ниже оптимального наблюдается сильное уменьшение активности. Напротив увеличение соотношения отражается на активности Sma nuc незначительно.

Также было установлено, что не существует некоторой постоянной концентрации субстрата для проявления максимальной активности эндонуклеазы. Найдено оптимальное соотношение фермента и субстрата [16].

Неоднократно проводилось исследование влияния нуклеотидов на активность Sma nuc [13, 17, 18]. Хотя основная тенденция в действии нуклеотидов на

активность эндонуклеазы была, как казалось, установлена, однако полностью картина их действия оставалась не выясненной. Представленные в печати результаты выглядели фрагментарно и противоречиво. Так, например, было показано, что АМР вызывает торможение ДНКазной активности на 75–100% при концентрации нуклеотида 0.2 мМ и, напротив, – лишь на 50% при концентрации 0.7 мМ [13, 17]. Кроме того, необходимо отметить, что в основном исследования были выполнены в отношении АМР и АТР, а также в отношении ДНКазной активности фермента. Остальные нуклеотиды так же, как и их влияние на РНКазную активность, были исследованы значительно слабее.

Поскольку мононуклеотиды являются одной из фракций продуктов гидролиза субстрата эндонуклеазой [12, 19], представляло интерес качественно и количество оценить их влияние на ход ферментативной реакции, что стало целью работы.

1. Материалы и методы

В работе использовали препараты дрожжевой ДНК («Вектор», Новосибирск) и РНК («US Biochemical Corporation», США). Нуклеаза *S. marcescens* была представлена изоформой Sm2, выделенной и охарактеризованной ранее [7, 20]. Водные растворы рибо- и дезоксирибонуклеозидмонофосфатов: 5'AMP, 5'UMP, 5'CMP, 5'GMP («Sigma», США), 5'dAMP, 5'dTMP, 5'dCMP, 5'dGMP («ICN», США), а также рибонуклеозидтрифосфатов: АТР, УТР («USB», Германия), СТР, ГТР («Sigma», США) предварительно смешивали с эквимолярным количеством MgSO₄. Для определения эффекта мононуклеотиды добавляли в реакционную смесь перед непосредственным внесением фермента.

Активность нуклеазы определяли методом кислоторастворимых фракций. Реакционная смесь содержала 0.01% ДНК или РНК, 50 мМ Трис-НСl буфер, рН 8.5, 6 мМ MgSO₄, 0.3 мМ нуклеотид. В контроле нуклеотид отсутствовал. Гидролиз субстрата инициировали добавлением к реакционной смеси 32.8 нМ раствора эндонуклеазы при исследовании нуклеозидтрифосфатов или 13.1 нМ – при исследовании нуклеозидмонофосфатов. Инкубацию проводили при 37°C. Время инкубации подбиралось так, чтобы в кислоторастворимые продукты превращалось не более 75% субстрата. Реакцию прекращали добавлением охлажденной 4%-ной HClO₄. Осадок удаляли центрифугированием и определяли A₂₆₀ надосадочной жидкости. За единицу активности принимали количество фермента, которое вызывало увеличение A₂₆₀ в 1 мл раствора на 1 оптическую единицу за 1 ч инкубации при 37°C.

Все серии опытов с каждым из исследуемых нуклеотидов проводили не менее чем в шести повторностях. Статистическую обработку результатов проводили с использованием программы Sigma Plot для доверительного интервала 95%.

2. Результаты и обсуждение

Для достижения поставленной цели были выбраны следующие концентрации и соотношения. Исследование нуклеозидмоно- и нуклеозидтрифосфатов проводили при избытке субстрата, то есть при соотношении фермент/субстрат

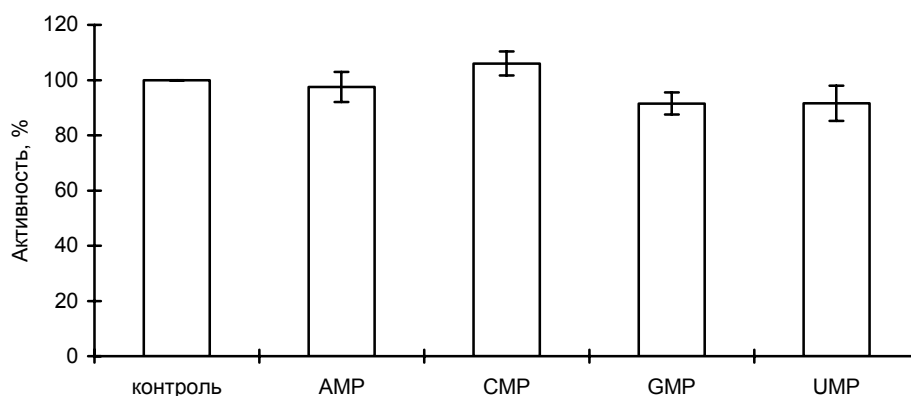


Рис. 1. ДНКазная активность в отсутствии (контроль) и в присутствии рибонуклеозид-монофосфатов (средняя активность \pm стандартная ошибка при $n = 5$ здесь и далее)

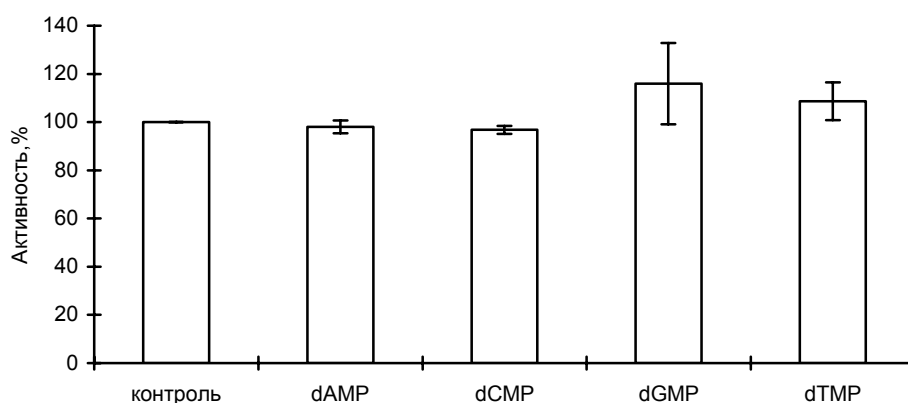


Рис. 2. ДНКазная активность в отсутствии и в присутствии дезоксирибонуклеозид-монофосфатов

1.3–3.2 пмоль/мг [16], что вызывало превращение в кислоторастворимые фракции не более 50% субстрата. Соотношение $Mg^{2+}/\text{фосфор}_{\text{субстрата}}$ составляло 40 : 1. Нуклеотиды добавляли в эквимолярном к концентрации субстрата количестве. Во избежание изменения соотношения $Mg^{2+}/\text{фосфор}_{\text{субстрата}}$ к нуклеотидам перед внесением в реакцию смесь прибавляли эквимолярное количество Mg^{2+} , так как известно, что нуклеотиды связывают Mg.

Результаты определения активности Sma nuc в отношении ДНК в отсутствии, принятом за контроль, и в присутствии мононуклеотидов представлены на рис. 1 и 2.

Как видно из рис. 1, присутствие 0.3 мМ AMP, GMP, UMP и CMP вызывало изменение ДНКазной активности. Однако статистический анализ показал отсутствие достоверной разницы между активностью фермента в отсутствии и в присутствии нуклеотидов, из чего можно заключить, что при выбранных концентрациях и соотношениях рибонуклеозидмонофосфаты не оказывали влияния на ДНК-азную активность Sma nuc.

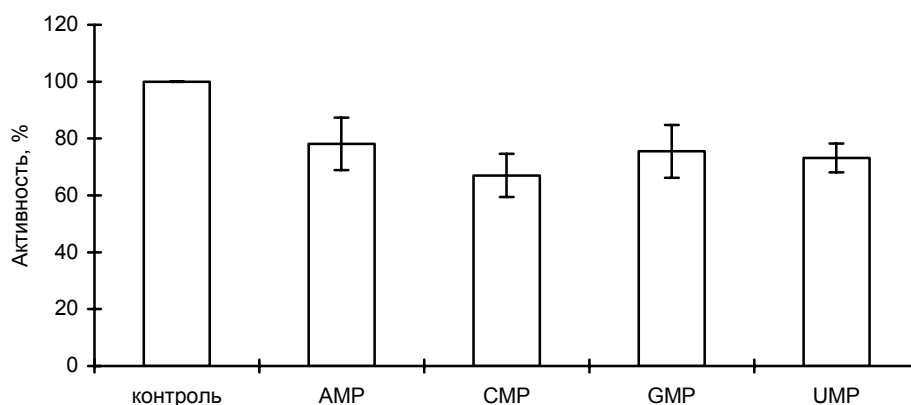


Рис. 3. РНКазная активность в отсутствии и в присутствии рибонуклеозидмонофосфатов

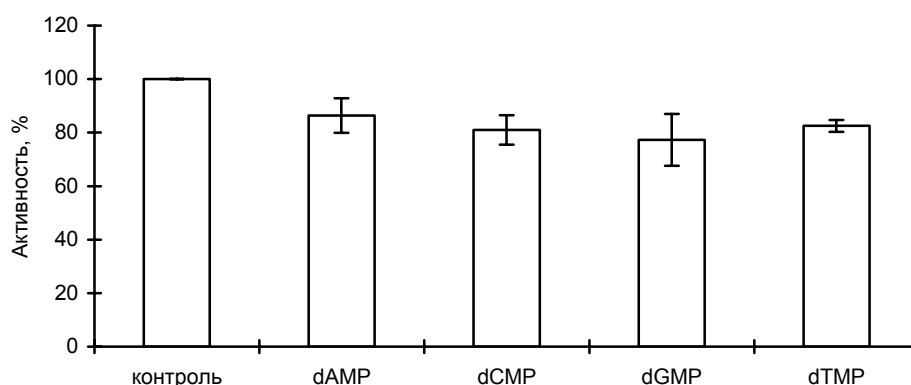


Рис. 4. РНКазная активность в отсутствии и в присутствии дезоксирибонуклеозидмонофосфатов

Установленный эффект не зависел от типа азотистого основания и отличался от результатов, полученных ранее. Так, ранее было показано, что присутствие CMP в концентрации 7 мкМ вызывало увеличение ДНКазной активности более чем в 2 раза, а 2 мкМ – снижение активности более чем в 3 раза [17]. В присутствии AMP в концентрациях 0.2 мМ и 7 мкМ активность нуклеазы в отношении ДНК составляла 19 и 74% соответственно [13, 17]. Присутствие 0.7 и 2 мкМ GMP вызывало полную потерю ДНКазной активности [17].

Сведения о влиянии на ДНКазную активность дезоксирибонуклеозидмонофосфатов в литературе отсутствуют. Поэтому данное исследование представляло особый интерес.

Анализ полученных результатов показал, что, несмотря на видимое отличие ДНКазной активности в присутствии dGMP, dCMP, dTMP, dAMP от активности в их отсутствии, статистически достоверного влияния на ДНКазную активность *Sma* *pis* дезоксирибонуклеозидмонофосфаты не оказывали (рис. 2).

Влияние мононуклеотидов на РНКазную активность представлено на рис. 3 и 4.

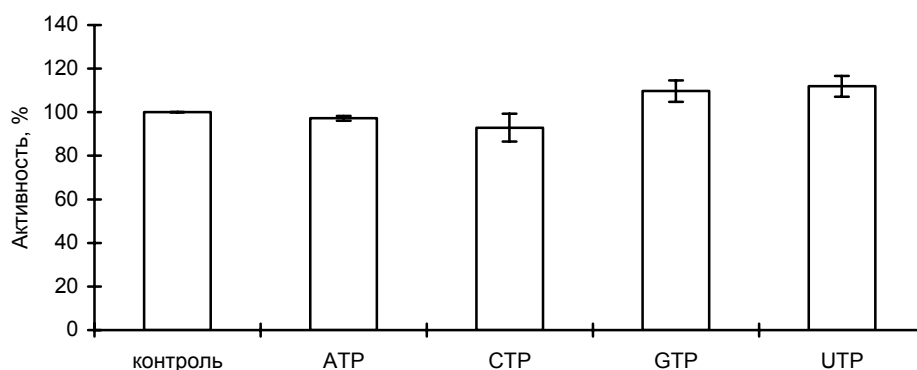


Рис. 5. ДНКазная активность в отсутствии и в присутствии рибонуклеозидтрифосфатов

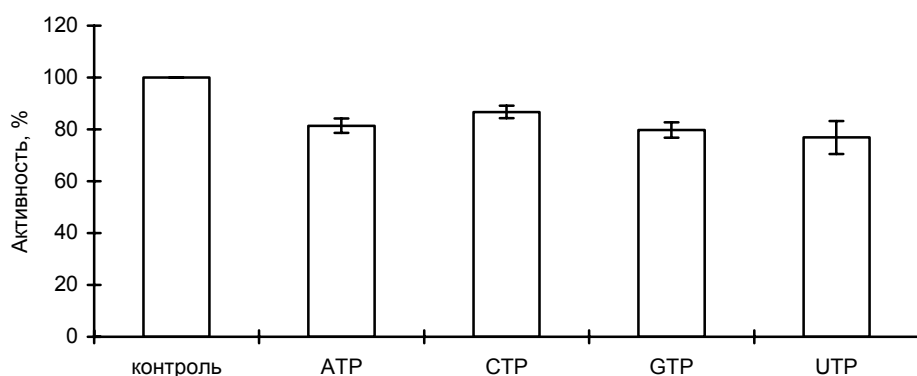


Рис. 6. РНКазная активность в отсутствии и в присутствии рибонуклеозидтрифосфатов

Анализ полученных результатов выявил достоверность разницы между активностью *Sma nuc* в отсутствии и в присутствии исследованных нуклеотидов. Добавление нуклеотидов вызывало уменьшение активности *Sma nuc* в 1.2–1.3 раза. Несмотря на кажущееся различие значений, было установлено, что ни тип углеводного компонента, ни тип азотистого основания не влияли на величину изменения активности, что служило отличием вновь полученных данных от ранее опубликованных результатов [17].

Последнее стало предпосылкой к определению активности *Sma nuc* в присутствии нуклеозидтрифосфатов. Результаты исследования представлены на рис. 5 и 6.

Как видно из рис. 5, исследованные рибонуклеозидтрифосфаты не оказывали существенного влияния на ДНКазную активность эндонуклеазы. В отношении РНК действие рибонуклеозидтрифосфатов было аналогично действию рибонуклеозидмонофосфатов (рис. 6). Независимо от типа азотистого основания рибонуклеозидтрифосфаты вызывали уменьшение активности *Sma nuc* в 1.2–1.3 раза. Представленные в литературе сведения о влиянии нуклеозидтрифосфатов на активность *Sma nuc* ограничены АТФ и так же, как и при исследовании других нуклеотидов, были довольно противоречивыми. По одним данным, даже 0.2 мМ АТФ вызвал почти полную потерю ДНКазной активности (до

6%) [13], по другим – даже в присутствии 5 мМ АТФ остаточная активность Sma пус в отношении ДНК составляла около 20% [18]. Аналогичные результаты были получены и по влиянию АТФ на РНКазную активность Sma пус [18].

Несоответствие вновь полученных и литературных данных можно объяснить тем, что исследования по влиянию нуклеотидов на активность Sma пус выполнены при разных соотношениях как фермент/субстрат, так и Mg^{2+} /фосфор_{субстрата}. Так, например, при исследовании влияния АМР или АТФ соотношение Mg^{2+} /фосфор_{субстрата} изменялось от 1 : 5 до 40 : 1, а для GMP, CMP – от 3 : 1 до 1 : 5. Кроме этого и концентрации исследуемых нуклеотидов сильно различались [13, 16, 17].

Таким образом, результаты исследования влияния нуклеотидов на активность эндонуклеазы бактерий *Serratia marcescens*, полученные с учетом сформировавшегося представления о механизме действия Mg^{2+} на активность эндонуклеазы [10], об оптимальных соотношениях фермента и субстрата [16], Mg^{2+} и фосфора субстрата [10], свидетельствовали о том, что дезоксирибо- и рибонуклеозидмонофосфаты, а также рибонуклеозидтрифосфаты, добавленные в эквимольном к концентрации субстрата количестве, не оказывают влияния на ДНКазную активность Sma пус и снижают РНКазную активность в 1.2–1.3 раза. Установленный эффект не зависел от типа азотистого основания, числа фосфатных групп и углеводного компонента.

Работа поддержана грантами НИОКР АН РТ (№ 07-7.3-272) и Минобразования Науки (№ Е 006-6.0-14, Е 02-6.0-269), за что авторы выражают особую благодарность.

Summary

Ju.D. Shabaeva, I.V. Ignatieva, M.N. Filimonova. Influence of mononucleotides on DNase and RNase activity of *Serratia marcescens* endonuclease at optimal concentration of Mg ions.

The influence of the nucleotides on DNA and RNA activity of endonuclease from *Serratia marcescens* was studied in conditions of optimal correlation of Mg/P_{substrat} . It was shown that all investigated nucleotides in independence on amount of phosphates, type of the base and carbohydrate residues, was added in equimolar concentration with amount of substrate, reliable decrease RNA activity and not influence on DNA activity.

Литература

1. Biedermann K., Jepsen P., Riise E., Svendsen I. Purification and characterization of *Serratia marcescens* nuclease produced by *E. coli* // Carlsberg Res. Commun. – 1989. – V. 54. – P. 17–27.
2. Miller M., Tanner J., Alpaugh M., Benedik M., Krause K. 2,1 Å structure of *Serratia* endonuclease suggest a mechanism for binding to double-stranded DNA // Nature Struct. Biol. – 1994. – No 1. – P. 461–468.
3. Friedhoff P., Kolmes B., Gimadudinow O., Wende W., Krause K., Pingoud A. Analysis of the mechanism of the *Serratia* nuclease using site-directed mutagenesis // Nucleic Acids Research. – 1996. – V. 24, No 14. – P. 2632–26394.

4. Аликин Ю.С., Масычева В.И., Клименко В. П. Эндоглиокин, препарат против вирусных заболеваний // Пчеловодство. – 1985. – № 5. – С. 42–44.
5. Аликин Ю.С., Серженко Л.П., Клименко В.П. Развитие технологий получения и перспективы использования эндонуклеазы *Serratia marcescens* // Ферменты микроорганизмов: Сб. докл. 11 Всерос. конф. – Казань, 1988. – С. 152–163.
6. Салганик Р.И., Загребельный С.Н., Грачева С.Ф. Эндонуклеаза бактериальная – средство профилактики вирусного паралича пчел // Ветеринария. – 1985. – № 5. – С. 41–44.
7. Педерсен Ю., Филимонова М., Роенсторф П., Бидерман К. Характеристика изоформ нуклеазы *Serratia marcescens* электроспрей-масс-спектрометрией // Биохимия. – 1995. – Т. 6, № 3. – С. 450–461.
8. Педерсен Ю., Андерсен Ж., Роенсторф П., Филимонова М., Бидерман К. Нуклеазы *Serratia marcescens* I. Сравнение природной и рекомбинантной нуклеаз с использованием электроспрей масс-спектрометрией // Биохимия. – 1995. – Т. 60. – С. 462–469.
9. Филимонова М.Н., Гарусов А.В., Сметанина Т.А., Андреева М.А., Богомольная Л.М., Лецинская И.Б. Изоформы нуклеазы *Serratia marcescens*. Сравнительный анализ субстратной специфичности // Биохимия. – 1996. – Т. 61, Вып. 10. – С. 1800–1806.
10. Филимонова М.Н., Губская В.П., Нуретдинов И.А., Бенедик М.Дж., Богомольная Л.М., Андреева М.А., Лецинская И.Б. Изоформы нуклеазы *Serratia marcescens*. Роль ионов Mg^{2+} в механизме гидролиза // Биохимия. – 1997. – Т. 62. – С. 1148–1154.
11. Филимонова М.Н., Бенедик М., Уразов Н.Г., Лецинская И.Б. Полидисперсия нуклеазы *Serratia marcescens* при оптимуме pH // Прикладная биохимия и микробиология. – 1999. – Т. 35. – С. 20–24.
12. Nestle M., Roberts W. An extracellular nuclease from *Serratia marcescens*. I. Purification and some properties of enzyme // J. Biol. Chem. – 1969. – V. 244. – P. 5213–5218.
13. Filimonova M.N., Krause K.L., Benedik M.J. Kinetic studies of the *Serratia marcescens* extracellular nuclease isoforms // Biochem. Mol. Biology Int. – 1994. – V. 33, No 6. – P. 1229–1236.
14. Филимонова М.Н., Балабан Н.П., Шарипова М.Р., Лецинская И.Б. Получение нуклеазы *Serratia marcescens* в гомогенном состоянии и изучение физико-химических свойств фермента // Биохимия. – 1980. – Т. 45, Вып. 11. – С. 2096–2103.
15. Филимонова М.Н., Баратова Л.А., Воспельникова Н.Д., Желтова А.О., Лецинская И.Б. Эндонуклеаза *Serratia marcescens*. Характеристика фермента // Биохимия. – 1981. – Т. 46, Вып. 9. – С. 1660–1666.
16. Филимонова М.Н., Бенедик М.Дж. Нуклеаза *Serratia marcescens*. Отношение концентраций фермента и субстрата для проявления максимальной активности // Биохимия. – 1995. – Т. 60, Вып. 9. – С. 1449–1500.
17. Лецинская И.Б., Балабан Н.П., Егорова Г.С., Таняшин В.И., Третьяк Т.М. Получение и характеристика высокоочищенного препарата *Serratia marcescens* // Биохимия. – 1974. – Т. 39. – С. 116–122.
18. Yonemura K., Matsumoto K., Maeda H. Isolation and characterization of nucleases from clinical isolate of *Serratia marcescens* kums 3958 // J. Biochem. (Tokio). – 1982. – V. 93, No 5. – P. 1287–1295.
19. Eaves G.N. Isolation and properties of an exocellular nuclease of *Serratia marcescens* // J. Bacteriol. – 1963. – V. 85. – P. 273–278.

20. Филимонова М.Н., Дементьев А.А., Лецинская И.Б., Бакулина Г.Ю., Шляпников С.В. Выделение и характеристика изоформ внеклеточной нуклеазы *Serratia marcescens* // Биохимия. – 1991. – Т. 56, № 3. – С. 508–520.

Поступила в редакцию
28.05.06

Шабаета Юлиа Джафаровна – аспирант кафедры биохимии Казанского государственного университета.

E-mail: *Julia.Shabaeva@ksu.ru*

Игнатъева Ирина Вячеславовна – выпускница 2004 г. кафедры биохимии Казанского государственного университета.

Филимонова Мария Николаевна – доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник кафедры микробиологии Казанского государственного университета.

E-mail: *Maria.Filimonova@ksu.ru*