

УДК 577.151.3

**НОВЫЕ БИОХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА
ЭНДОНУКЛЕАЗЫ *Serratia marcescens***

Г.М. Галиева, М.Н. Филимонова

Аннотация

Показано, что присутствие в среде катионов магния или натрия в концентрации 0.2 М приводит к стабилизации активности изоформы Sm1 эндонуклеазы грамотрицательных бактерий *Serratia marcescens*, которая резко снижается в водной среде в их отсутствии. Установлено, что уровень структурной организации молекул изоформы Sm1 зависит от химического состава и pH окружающей среды, а также концентрации самого фермента. Оценка молекулярной массы белковых составляющих водных растворов изоформы Sm1 гельхроматографией на колонке с сефадексом G-100 показала, что 23 нМ раствор представляет собой смесь белковых агрегатов и димеров, а 0.23 нМ раствор – смесь мономеров и димеров. В присутствии 0.2 М сульфата магния 23 нМ водный раствор изоформы Sm1 представляет собой смесь мономеров и димеров, которые диссоциируют в мономеры в результате краткосрочной инкубации. При оптимальном значении pH 0.23–23 нМ эндонуклеаза в 0.1 М Трис-HCl буфере представляет собой смесь димеров и мономеров с выраженным преобладанием последних.

Ключевые слова: эндонуклеазы *Serratia marcescens*, димеры, мономеры, катионы магния.

Введение

В настоящее время эндонуклеаза грамотрицательных бактерий *Serratia marcescens* – это одна из наиболее изученных бактериальных нуклеаз. Установлены основные биохимические свойства, структура, каталитически значимые аминокислотные остатки, предложены модели механизма действия [1–12].

В последние годы было показано, что при оптимальном значении pH раствор эндонуклеазы содержит димеры и мономеры [13]. Одновременно димеры эндонуклеазы были получены из мономеров путем введения точечных аминокислотных замен и последующей сшивки специально сконструированным агентом [14]. Данные о существовании димеров эндонуклеазы были также получены в результате компьютерного моделирования [15]. При этом отсутствуют сведения об условиях, вызывающих ассоциацию или диссоциацию молекул эндонуклеазы, а также информация о том, как влияет ассоциация/диссоциация на свойства эндонуклеазы. Поскольку установлено, что межбелковые взаимодействия модулируют функциональную активность ряда ферментов [16, 17], вероятно, изменение структурной организации молекул эндонуклеазы *S. marcescens* также будет отражаться на ее биохимических свойствах.

Таким образом, исследование проводилось с целью определения влияния концентрации фермента, а также химического состава и рН окружающей среды на уровень структурной организации эндонуклеазы.

Материалы и методы

Объектом исследования служил ранее выделенный и охарактеризованный [4, 10] препарат изоформы Sm1 эндонуклеазы грамотрицательных бактерий *Serratia marcescens*.

Подготовка препарата к исследованию включала растворение лиофильно высушенного вещества в дистиллированной воде и последующую гельфильтрацию раствора при 8 °С на колонке (0.9 × 10 см) с сефадексом G-25 fine (Pharmacia, Швеция), уравновешенной десятикратным к объему сефадекса объемом дистиллированной воды. Элюцию проводили дистиллированной водой. В полученных фракциях и в исходном препарате определяли ферментативную активность и содержание белка.

Нуклеазную активность определяли методом кислоторастворимых фракций [7]. Для этого в реакционную смесь, состоящую из 0.4 мл 0.2 М Трис-НСI буфера, рН 8.5, содержащего 0.02 М MgSO₄·6H₂O, и 0.5 мл 0.2%-ного водного раствора ДНК, добавляли 0.1 мл исследуемого раствора. Смесь инкубировали 15 мин при 37 °С. Ферментативную реакцию останавливали добавлением 1 мл охлажденной 4%-ной хлорной кислоты. Смесь выдерживали 10 мин на ледяной бане. Образовавшийся осадок отделяли центрифугированием при 12 тыс. об./мин. в течение 10 мин. Надосадочную жидкость собирали и разводили дистиллированной водой в 20 раз. Затем измеряли оптическую плотность полученного раствора на спектрофотометре СФ-46 при 260 нм. Параллельно ставили контроль на качество используемого субстрата, где вместо исследуемого раствора в реакционную смесь добавляли 0.1 мл дистиллированной воды.

При необходимости в метод определения активности вносили собственные модификации, увеличивая время инкубации реакционной смеси до 60 мин и более и уменьшая разведение надосадочной жидкости в 2–4 раза.

Содержание белка оценивали, измеряя поглощение ферментного раствора при 280 нм на спектрофотометре СФ-46. За единицу белка принимали оптическое поглощение раствора, измеренное в кювете с длиной оптического пути 10 мм, равное единице (A_{280}). Концентрацию белка рассчитывали, исходя из коэффициента поглощения 47292 М⁻¹·см⁻¹ [9].

Для определения молекулярной массы проводили **гельхроматографию** белковых растворов на колонке (0.8 × 16 см) с сефадексом G-100 при 8 °С, предварительно уравновешенной раствором, состав которого соответствовал условиям эксперимента. Анализируемый образец или растворы маркерных белков наносили на колонку в объеме 0.1 мл. Маркерными белками служили бычий сывороточный альбумин (Laboratory chemicals division, Великобритания) и ДНКаза I (Завод медицинских препаратов Ленгорагропрома, Россия), молекулярные массы которых приближались к молекулярной массе димеров и мономеров эндонуклеазы соответственно, Элюцию проводили уравновешивающими растворами. Определяли объемы элюции анализируемых веществ, собирая фракции по 0.5–1.0 мл. Свободный объем колонки определяли, используя голубой декстран

(Serva, Германия), в соответствии с рекомендациями [18]. О молекулярной массе элюируемого белка судили по объему выхода, сопоставляя его с объемами выхода маркерных белков.

При определении влияния катионов магния на ассоциацию/диссоциацию молекул эндонуклеазы хроматографическую колонку уравнивали 0.2 М раствором $MgSO_4$. Раствор эндонуклеазы после гелефильтрации (фракция 2) разводили в 250 раз 0.2 М раствором $MgSO_4$ и наносили на колонку без преинкубации или после 4-минутной инкубации при 8 °С.

При определении влияния pH среды на уровень структурной организации эндонуклеазы колонку уравнивали 0.1 М Трис-НСl буфером, pH 8.5, и анализировали по молекулярной массе белковых составляющих 23–0.23 нМ растворы эндонуклеазы в уравнивающем буфере.

При определении уровня структурной организации эндонуклеазы в зависимости ее концентрации ферментный раствор после гелефильтрации (фракция 2) разводили водой или Трис-НСl буфером, pH 8.5, так, чтобы содержание эндонуклеазы в 1 мл приготовленного раствора составляло 23, 2.3 и 0.23 пмоль, и анализировали гелехроматографией.

Анализ изменения активности эндонуклеазы при краткосрочной инкубации в дистиллированной воде и в присутствии катионов магния или натрия проводили, смешивая в равных частях 2.3 мкМ водный раствор эндонуклеазы (фракция 2) с водой, или 0.4 М $MgSO_4$, или 0.4 М NaCl. Полученные смеси инкубировали 4 мин при +6 °С. За 100% принимали активность ферментного раствора в воде до инкубации.

Статистическую обработку данных проводили с использованием общепринятых математических средств для доверительного интервала 95%. Выбраковку данных проводили, используя программу статистического анализа графической программы Microsoft Excel.

Результаты и их обсуждение

Результаты гелефильтрации раствора эндонуклеазы на колонке с сефадексом G-25 представлены на рис. 1 и в табл. 1. Как видно из рисунка, фермент элюируется одним пиком с вершиной, совпадающей с объемом 5 мл. Фракция, соответствующая пику, содержала 38% белка, и ее активность составляла 39% от всего нанесенного на колонку (табл. 1). В целом выход по активности соответствовал 43.2%, а по белку – 92%, что предполагало потерю активности в результате ее снижения в ходе гелефильтрации. Поскольку при гелефильтрации происходит не только удаление низкомолекулярных примесей [18], включая катионы металлов с катионами магния в их числе, но и уменьшение концентрации эндонуклеазы за счет ее разбавления в 7–70 раз (табл. 1), в основе уменьшения ферментативной активности могла лежать как та, так и другая причина. Причем в пользу снижения активности за счет сокращения содержания белка свидетельствовало то, что при уменьшении концентрации фермента в 7 раз по сравнению с исходным раствором потеря активности не наблюдалась (табл. 1, фракция 2). А при уменьшении концентрации в 70 раз (табл. 1, фракция 4–8) наблюдалась полная потеря активности.

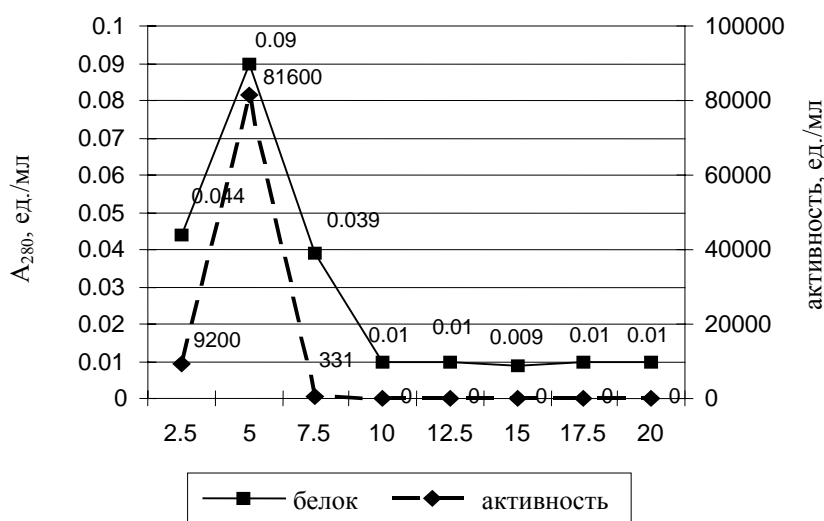


Рис. 1. Гельфильтрация эндонуклеазы на колонке (0.9 × 10 см) с сефадексом G-25

Табл. 1

Гельфильтрация эндонуклеазы на колонке с сефадексом G-25

Стадия	Объем, мл	Содержание белка			Активность		
		ед./мл	общее	%	ед./мл	общая	%
Исходный раствор	0.95	0.625	0.594	100	209 152	522 880	100
Элюция, № фракции:							
1.	2.5	0.044	0.110	19	9 200	23 000	4
2.	2.5	0.090	0.225	38	81 600	204 000	39
3.	2.5	0.039	0.098	17	331	828	0.2
4.	2.5	0.010	0.025	4	–	–	–
5.	2.5	0.010	0.025	4	–	–	–
6.	2.5	0.009	0.023	4	–	–	–
7.	2.5	0.010	0.025	4	–	–	–
8.	2.5	0.010	0.025	4	–	–	–
Элюат (сумма)	25	0.222	0.547	92	91 131	227 828	43.2

Для проверки гипотезы о снижении активности эндонуклеазы в результате удаления низкомолекулярных примесей исследовали изменение активности при краткосрочной инкубации фермента на холоде в дистиллированной воде и в присутствии 0.2 М сульфата магния. Результаты представлены на рис. 2.

Как видно из рис. 2, присутствие в среде катионов магния (вариант 2) замедляет потерю активности по сравнению с ее потерей в результате 4-минутной инкубации в дистиллированной воде (вариант 1). Для выяснения, что играет ведущую роль в стабилизации активности: тип катионов металла (магний) или изменение ионной силы среды, – параллельно исследовали изменение активности эндонуклеазы при инкубации в присутствии эквимольного количества катионов натрия. Результаты представлены на рис. 2 (вариант 3), откуда видно, что катионы натрия также стабилизируют активность эндонуклеазы, причем не хуже, чем катионы магния. Таким образом, во-первых, было показано, что снижение

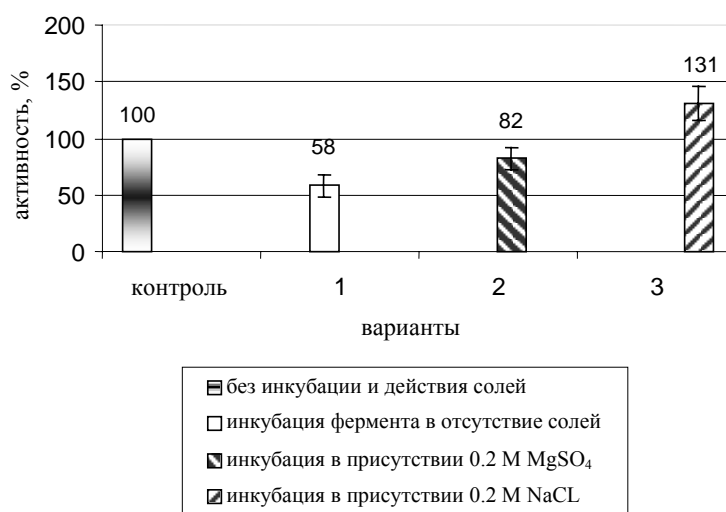


Рис. 2. Активность эндонуклеазы после 4-минутной инкубации в отсутствие и в присутствии катионов металлов

ионной силы среды в результате гельфильтрации может сопровождаться потерей ферментативной активности. Во-вторых, выявлено стабилизирующее действие на активность эндонуклеазы 0.2 М катионов магния или натрия.

Полученные результаты побудили нас провести сравнительный анализ 23 нМ растворов эндонуклеазы по молекулярной массе белковых составляющих в отсутствие и в присутствии 0.2 М катионов магния. Результаты представлены на рис. 3, 4. Из рис. 3 видно, что хроматографический профиль эндонуклеазы представлен двумя пиками, локализованными в области 2 и 3.5 мл, что соответствует свободному объему колонки, составляющему 2.5 мл, и объему элюции альбумина, доминирующий пик которого расположен в области 2.5–3.5 мл. Следовательно, 23 нМ водный раствор эндонуклеазы представляет собой смесь белковых агрегатов с молекулярной массой более 150 кДа и димеров с молекулярной массой около 60 кДа.

Хроматографический профиль эндонуклеазы, смешанной с 0.2 М MgSO₄, также включал два пика (рис. 4). Однако вершины этих пиков были локализованы в области 3 и 6 мл, что совпадало с объемами элюции доминирующих в препаратах альбумина и ДНКазы I фракций (2.5–3.5 и 3.5–7.5 мл соответственно). Следовательно, 23 нМ эндонуклеаза в присутствии катионов магния представляла собой смесь димеров и мономеров. При этом агрегаты с молекулярной массой свыше 150 кДа обнаружены не были. Таким образом, полученный результат свидетельствовал о том, что катионы магния способствовали диссоциации олигомеров эндонуклеазы, в результате чего в препарате эндонуклеазы появлялась фракция мономеров и исчезала фракция высокомолекулярных агрегатов, выявленная в водном растворе (рис. 3). Для подтверждения этого заключения дополнительно (до нанесения на колонку) провели 4-минутную преинкубацию 23 нМ эндонуклеазы в присутствии 0.2 М MgSO₄ на холоде, затем определили молекулярную массу белковых составляющих гельхроматографией. В результате, как видно из рис. 4, хроматографический профиль содержал лишь один пик, расположенный

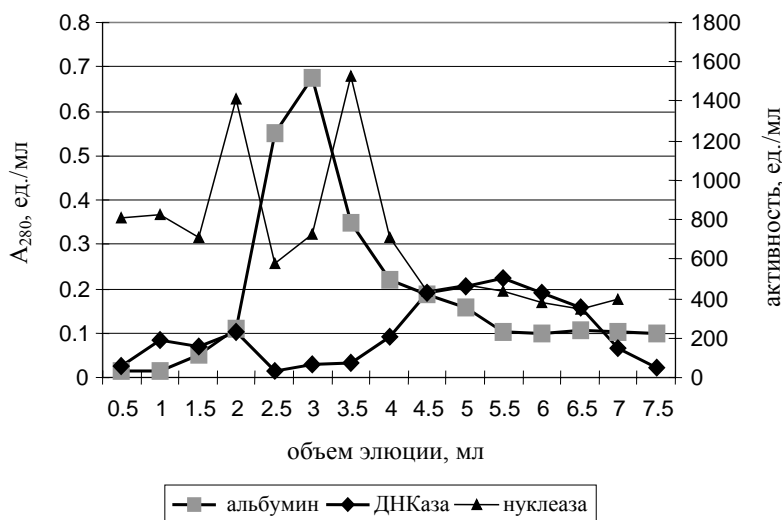


Рис. 3. Гельхроматография 23 нМ эндонуклеазы на колонке, уравновешенной дистиллированной водой

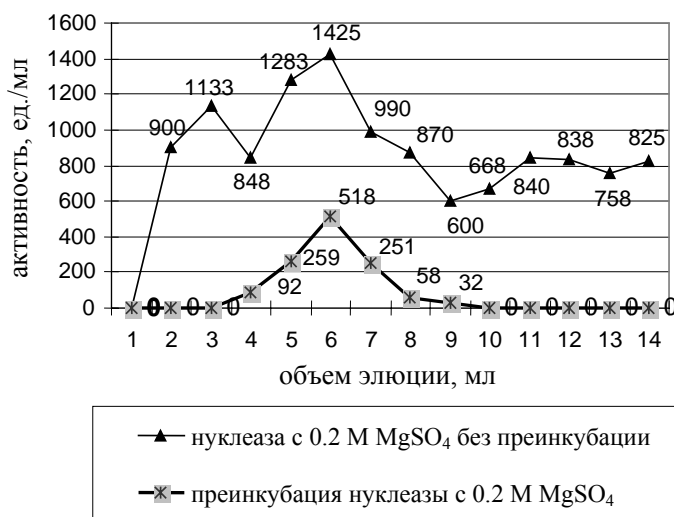


Рис. 4. Гельхроматография 23 нМ эндонуклеазы на колонке, уравновешенной 0.2 М MgSO₄

в области 4–8 мл, с вершиной, локализованной в области 6 мл. Таким образом, показано, что предварительная 4-минутная инкубация раствора эндонуклеазы с катионами магния приводила к полной диссоциации димеров в мономеры.

Результаты изучения влияния pH среды на уровень структурной организации молекул эндонуклеазы представлены на рис. 5. Как видно из рис. 5, а, хроматографический профиль 23 нМ эндонуклеазы представлен большим пиком, расположенным в области элюции мономеров – 4–9 мл, и двумя малыми пиками, один из которых расположен в области элюции димеров – 1–3 мл. Существенное преобладание большого пика над двумя остальными позволяет заключить, что

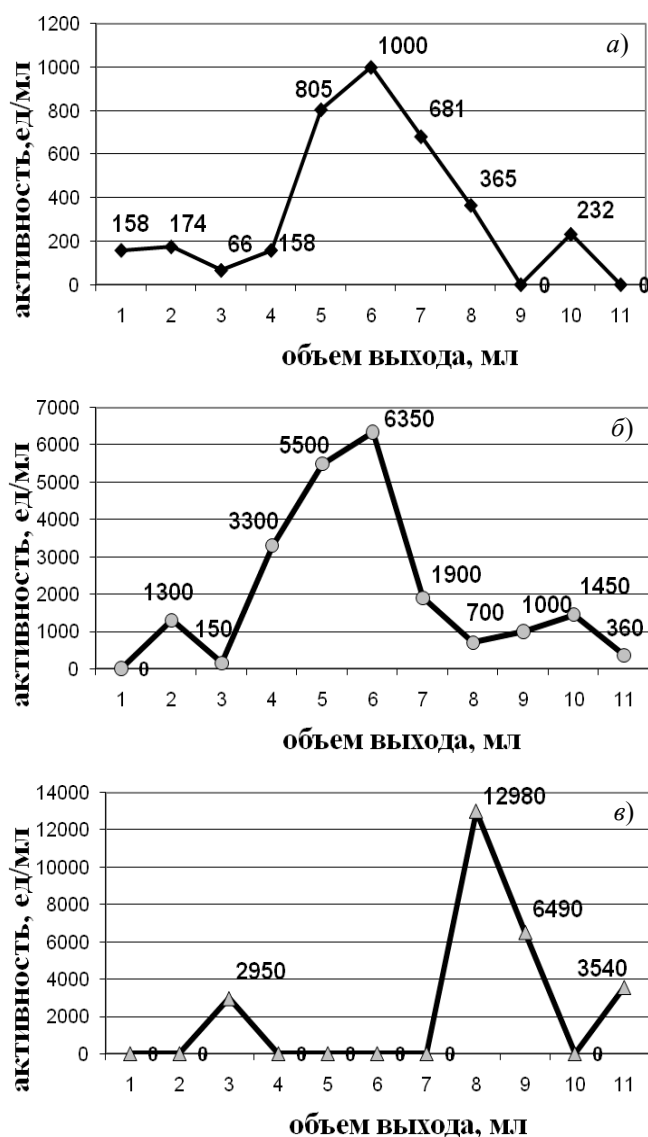


Рис. 5. Гельхроматография 23 нМ (а), 2.3 нМ (б) и 0.23 нМ (в) эндонуклеазы на колонке, уравновешенной 0.1 М Трис-НСl буфером, рН 8.5

при рН 8.5 23 нМ эндонуклеаза представлена в преобладающем большинстве мономерами. Снижение концентрации эндонуклеазы в 10 и 100 раз не привело к принципиальным изменениям полученной картины (рис. 5, б и в). Таким образом, установлено, что при оптимальном значении рН (в 0.1 М Трис-НСl буфере, рН 8.5) 0.23–23 нМ эндонуклеаза представляет собой смесь димеров и мономеров с преобладанием последних.

Хотя зависимость содержания димеров и мономеров от концентрации эндонуклеазы в 0.1 М Трис-НСl буфере, рН 8.5, не установлена, ее удалось обнаружить при исследовании водных растворов эндонуклеазы. В частности, показано, что уменьшение концентрации эндонуклеазы до 0.23 нМ приводило к диссоциации олигомеров и димеров, присутствующих в 23 нМ растворе (рис. 3),

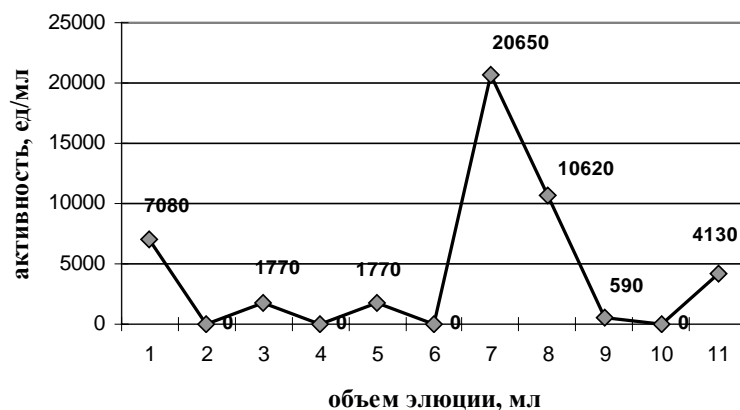


Рис. 6. Гельхроматография 0.23 нМ эндонуклеазы на колонке, уравновешенной дистиллированной водой

в мономеры (рис. 6). Как видно из рисунка, хроматографический профиль 0.23 нМ эндонуклеазы представлен четырьмя малыми пиками с вершинами, локализованными в области 1, 3, 5 и 11 мл соответственно, и одним большим пиком в области 6–9 мл, что соответствует позиции мономеров. Существенное преобладание большого пика над остальными позволяет заключить, что водный раствор 0.23 нМ эндонуклеазы представлен в преобладающем большинстве мономерами.

Таким образом, установлено, что в присутствии 0.2 М катионов магния или 0.1 М Трис-НСl буфера, рН 8.5, что соответствует стандартным условиям определения ферментативной активности, 23 нМ изоформа Sm1 эндонуклеазы *S. marcescens* в преобладающем большинстве представлена фракцией мономеров. К диссоциации олигомеров эндонуклеазы с увеличением доли мономеров также приводит уменьшение концентрации фермента в воде. Показано, что при инкубации в водной среде происходит быстрое снижение активности низкоконцентрированной эндонуклеазы, замедлить которое удастся повышением ионной силы среды путем добавления катионов магния или натрия.

Summary

G.M. Galieva, M.N. Filimonova. Novel Biochemical Properties of Serratia marcescens Nuclease.

Stabilization of activity of endonuclease (Sm1 isoform) isolated from Gram-negative bacteria *Serratia marcescens* was observed in the presence of 0.2 M magnesium or sodium cations. This activity sharply decreased in water in their absence. Structural organization of Sm1 isoform molecules was found to depend on chemical composition and pH of the solution as well as the enzyme concentration. Molecular mass analysis of protein molecules in water solutions of Sm1 isoform made by Sephadex G-100 chromatography displayed that 23 nM solution contained protein aggregates and dimers, and 0.23 nM solution contained dimers and monomers. In the presence of 0.2 M magnesium sulfate, 23 nM water solution of Sm1 isoform was found to be a mixture of monomers and dimers dissociating to the monomers after a short-term incubation. At the optimal pH, 0.23–23 nM endonuclease dissolved in 0.1 M Tris-HCl buffer consisted of dimers and monomers with a pronounced domination of the latter.

Key words: *Serratia marcescens* endonuclease, dimers, monomers, magnesium cations.

Литература

1. Biedermann K., Jepsen P.K., Riise E., Svendsen I. Purification and characterization of a *Serratia marcescens* nuclease produced by *Escherichia coli* // Carlsberg Res. Commun. – 1989. – V. 54. – P. 17–27.
2. Miller M.D., Tanner J., Alpaugh M., Benedik M.J., Krause K.L. 2.1 Å structure of *Serratia* endonuclease suggests a mechanism for binding to double-stranded DNA // Nature Struct. Biol. – 1994. – V. 1, No 7. – P. 461–468.
3. Педерсен Ю., Андерсен Ж., Роенсторф П., Филимонова М.Н., Бидерман К. Нуклеаза *Serratia marcescens*. Сравнение природной и рекомбинантной нуклеаз с использованием электроспрей масс-спектрометрии // Биоорган. химия. – 1995 – Т. 21, Вып. 5. – С. 330–335.
4. Педерсен Ю., Филимонова М.Н., Роенсторф П., Бидерман К. Нуклеаза *Serratia marcescens*. Анализ первичных структур путем пептидного картирования в комбинации с плазменно-десорбционной масс-спектрометрией // Биоорган. химия. – 1995 – Т. 21, Вып. 5. – С. 336–344.
5. 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, Вып. 9. – С. 1148–1154.
6. 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. 1800–1805.
7. Лецинская И.Б., Балабан Н.П., Егорова Г.С., Таняшин В.И., Третьяк Т.М. Получение и характеристика высокоочищенного препарата нуклеазы *Serratia marcescens* // Биохимия. – 1974. – Т. 39, Вып. 1 – С. 116–122.
8. Филимонова М.Н., Балабан Н.П., Шарипова Ф.Р., Лецинская И.Б. Получение нуклеазы *Serratia marcescens* в гомогенном состоянии и изучение физико-химических свойств фермента // Биохимия. – 1980. – Т. 45, Вып. 11. – С. 2096–2102.
9. Филимонова М.Н., Баратов Л.А., Воспелников Н.Д., Желтова А.О., Лецинская И.Б. Эндонуклеаза *Serratia marcescens*. Характеристика фермента // Биохимия. – 1981. – Т. 46, Вып. 9. – С. 1660–1665.
10. Филимонова М.Н., Дементьев А.А., Лецинская И.Б., Бакулина Г.Ю., Шляпников С.П. Выделение и характеристика изоформ внеклеточной нуклеазы *Serratia marcescens* // Биохимия. – 1991. – Т. 56, Вып. 3. – С. 508–519.
11. 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.
12. Nestle M., Roberts W.J. An extracellular nuclease from *Serratia marcescens*. Purification and some properties of the enzyme // J. Biol. Chem. – 1969. – V. 244, No 19. – P. 5213–5218.
13. Филимонова М.Н., Бенедик М.Дж., Уразов Н.Г., Лецинская И.Б. Полидисперсность нуклеазы *Serratia marcescens* при оптимальном значении pH // Прикл. биохимия и микробиол. – 1999. – Т. 35, Вып. 1. – С. 20–24.
14. Franke I., Meiss G., Pingoud A. On the Advantage of Being a Dimer, a Case Study Using the Dimeric *Serratia* Nuclease and the Monomeric Nuclease from *Anabaena* sp. Strain PCC 7120 // J. Biol. Chem. – 1999. – V. 274, No 2. – P. 825–832.
15. Chen C., Beck B.W., Krause K., Weksberg T.E., Pettitt B.M. Effects of Dimerization of *Serratia marcescens* Endonuclease on Water Dynamics // Biopolymers. – 2006. – V. 85, No 2. – P. 2–13.

16. *Rudyak S.G., Brenowitz M., Shrader T.E.* Mg²⁺-linked oligomerization modulates the catalytic activity of the Lon (La) protease from *Mycobacterium smegmatis* // *Biochemistry*. – 2001. – V. 40, No 31. – P. 9317–9323.
17. *Edmonds L., Liu A., Kwan J.J., Avanesy A., Caracoglia M., Yang I., Maxwell K.L., Rubinstein J., Davidson A.R., Donaldson L.W.* The NMR structure of the gpU tail-terminator protein from bacteriophage lambda: identification of sites contributing to Mg(II)-mediated oligomerization and biological function // *J. Mol. Biol.* – 2007. – V. 365, No 1. – P. 175–186.
18. *Детерман Г.* Гель-хроматография. – М.: Мир, 1970. – 252 с.

Поступила в редакцию
01.07.10

Галиева Гульназ Мунировна – магистр биолого-почвенного факультета Казанского (Приволжского) федерального университета.

E-mail: *Motulek_88@mail.ru*

Филимонова Мария Николаевна – доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник НИЛ биосинтеза и биоинженерии ферментов Казанского (Приволжского) федерального университета.

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