



УДК 577.112.0.12 : 543.422

© 1990 г.

УФ- И КД-СПЕКТРЫ РЕСТРИКЦИОННОЙ ЭНДОНУКЛЕАЗЫ
EcoRII И ДНК-МЕТИЛАЗЫ *EcoRII*Вельяминов С. Ю., Косых В. Г.*, Холодков О. А.*,
Бурьянов Я. П.*Институт белка Академии наук СССР, Пушкино Московской обл.;
* Институт биохимии и физиологии микроорганизмов Академии наук СССР,
Пушкино Московской области

Измерены УФ- и КД-спектры гомогенных ферментов. Из УФ-спектров вычислены молярные коэффициенты поглощения, а из КД-спектров — процентное содержание канонических вторичных структур. Оба фермента имеют хорошо развитую третичную и высокоупорядоченную вторичную структуру, состоящую преимущественно из антипараллельных складчатых β -слоев. Методом КД-спектроскопии исследована тепловая денатурация. Показано, что рестрикционная эндонуклеаза необратимо денатурирует при 50° С, а ДНК-метилаза с частичной обратимостью при охлаждении — при 45° С.

Рестрикционные эндонуклеазы и ДНК-метилазы типа II узнают специфические нуклеотидные последовательности. Эндонуклеазы в большинстве имеют димерную организацию [1], хотя для некоторых из них показана мономерная структура [1]. ДНК-метилазы, как правило, имеют мономерную форму [1]. Ферменты системы рестрикции-модификации *EcoRII* представлены рестрикционной эндонуклеазой (*REcoRII*) и ДНК-метилазой (*MEcoRII*), которые узнают и взаимодействуют с палиндромом $CC \frac{A}{T} GG$ [2]. *REcoRII* представляет собой димер с молекулярной массой 89 564 [3, 4], а *MEcoRII* является мономерным белком с молекулярной массой 54 557 [5, 6].

В настоящей работе представлены УФ- и КД-спектры рестрикционной эндонуклеазы *EcoRII* и ДНК-метилазы *EcoRII*, оценены их молярные коэффициенты поглощения и процентное содержание канонических вторичных структур, а также термостабильность ферментов.

УФ-спектры. УФ-спектры *REcoRII* и *MEcoRII* — это типичные спектры белков в ближней УФ-области с максимумами около 280 нм и впадинами около 250 нм. Наличие перегибов в районе 290 и 265 нм указывает на значительное содержание триптофанов и фенилаланинов соответственно. Поглощение остатков триптофанила определяет и положение максимумов около 280 нм. Общий вид спектров (рис. 1) хорошо согласуется с данными о количестве ароматических аминокислот в аминокислотных последовательностях *REcoRII* и *MEcoRII* [4, 6]. Две нижние кривые показывают вклад светорассеяния в поглощение в области 250—300 нм. Рассеяние, обусловленное мутностью, зависит от длины волны λ как $1/\lambda^n$, где $n = 2 - 4$ (конкретная величина n определяется размерами и формой агрегатов белка). Чем меньше длина волны, тем больший вклад в кажущееся поглощение раствора белка вносит светорассеяние. Поэтому обычно используемое соотношение поглощений при 280 и 260 нм в качестве меры примесей нуклеиновых кислот в препаратах белков является условной величиной, сильно зависящей от количества, размеров и формы агрегатов белка и, кроме того, от количества остатков фенилаланина, сильно поглощающих в области 260 нм. Рассчитанное из рис. 1 отношение поглощений при 280 и 260 нм без учета светорассеяния для *REcoRII* равно 1,83, а с кор-

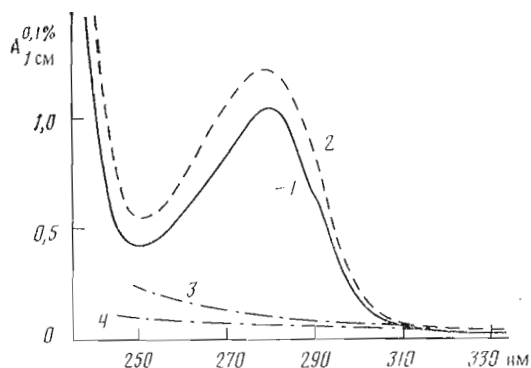


Рис. 1. УФ-спектры поглощения *REcoRII* (1) и *MEcoRII* (2). Кривые (3, 4) показывают вклад светорассеяния в поглощение в области 240—310 нм

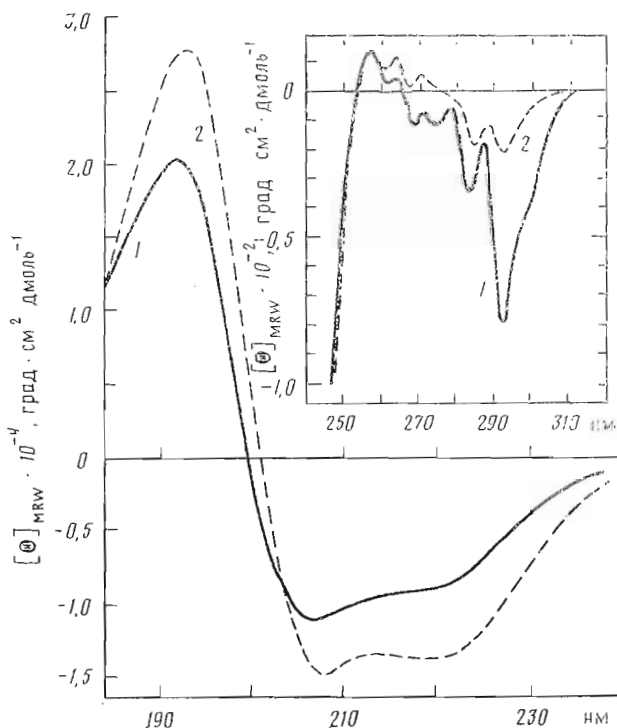


Рис. 2. Спектры КД (рН 7,4) в далекой и ближней (вставка) УФ-областях *REcoRII* (1) и *MEcoRII* (2)

рекция — 2,29. Соответствующие величины для *MEcoRII* равны 1,65 и 1,75.

Значение $A_{1\text{см}}^{0,1\%}$ с учетом вклада светорассеяния равно для *REcoRII* $0,97 \pm 0,01$ на длине волны 279,5 нм, а для *MEcoRII* — $1,17 \pm 0,16$ на длине волны 279,0 нм. Приведенные величины являются средними из четырех независимых измерений. Соответствующие молярные коэффициенты поглощения равны 43 259 и 63 832 $\text{M}^{-1}\text{см}^{-1}$. Вычисленные из аминокислотной последовательности молярные коэффициенты поглощения равны для *REcoRII* 37 771 и для *MEcoRII* 54 549 $\text{M}^{-1}\text{см}^{-1}$. Отношение экспериментально полученных к вычисленным значениям равно 1,15 для *REcoRII* и 1,17 для *MEcoRII*. Такие величины характерны для нативных структур глобулярных белков [7], и только для полностью развернутых белков это отношение близко к единице (т. е. все боковые группы ароматических аминокислот экспонированы).

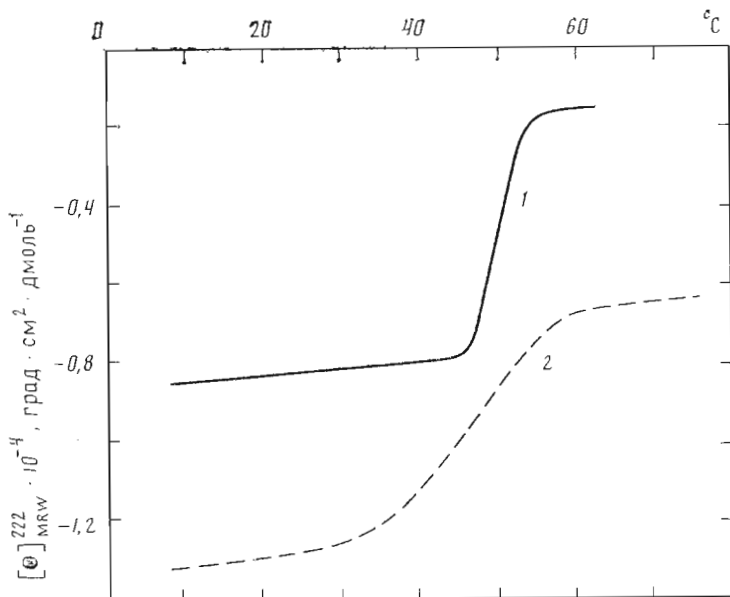


Рис. 3. Зависимость эллиптичности при 222 нм *REcoRII* (1) и *MEcoRII* (2) от температуры

КД-спектры. На рис. 2 приведены КД-спектры в далекой и ближней УФ-областях для *REcoRII* и *MEcoRII*. Спектры измерены при pH 7,4, т. е. в условиях, оптимальных для активности обоих ферментов. Спектры в ближней УФ-области (240—320 нм) имеют четко выраженную тонкую структуру с полосами при 262 и 268 нм, относящимися к фенилаланину, в области около 275 нм, относящейся к тирозинам, и при 284—285 и 292,5 нм, относящимися к триптофанам и/или тирозинам. Наличие выраженной тонкой структуры КД-спектров в ближней УФ-области свидетельствует о существенной асимметрии окружения боковых групп названных ароматических аминокислот, т. е. об их жесткой фиксации в третичной структуре и тем самым о хорошо развитой третичной структуре исследованных белков. Тепловая денатурация *REcoRII* и *MEcoRII* приводит к существенному уменьшению амплитуды и полному исчезновению тонкой структуры спектров КД в ближней УФ-области (спектры не приведены).

Спектры КД в далекой УФ-области (184—240 нм) для обоих белков характеризуются двумя минимумами в области 207—222 нм и одним максимумом в области 192—193 нм. Для *REcoRII* экстремумы спектра КД расположены при 192, 207 и 221 нм, кривая пересекает нулевую линию при 199,7 нм. Для *MEcoRII* экстремумы расположены при 193, 208 и 222 нм, пересечение нулевой линии — при 201 нм. КД-спектр *MEcoRII* имеет большую амплитуду по сравнению со спектром *REcoRII*. Спектры, имеющие такие амплитуды и такую форму, характерны для глобулярных белков с высокоупорядоченной вторичной структурой.

Расчет вторичной структуры по программам [8] дает следующие результаты: *REcoRII* содержит 22% α -спиралей, 64% антипараллельных складчатых β -слоев, 9% изгибов и поворотов и 5% неупорядоченной вторичной структуры; *MEcoRII* состоит из α -спиралей (44%), антипараллельных складчатых β -слоев (48%), изгибов и поворотов (4%) и неупорядоченной вторичной структуры (4%). Таким образом, упорядоченная вторичная структура, состоящая из α -спиралей и β -слоев, для исследованных белков включает в себя около 90% всех аминокислотных остатков.

Зависимости эллиптичности при 222 нм, являющейся мерой упорядоченности вторичной структуры белка, от температуры приведены на рис. 3. Видно, что для *REcoRII* эллиптичность слабо зависит от температуры в интервале 10—45° С, а затем в довольно узком интервале температур резко изменяется. Середина этого перехода находится при 50° С. Следует от-

метить, что тепловая денатурация этого фермента необратима при охлаждении раствора и сопровождается агрегацией и преципитацией, что несомненно искажает кривую плавления на рис. 3.

Средняя точка перехода для *MEcoRII* находится при 45° С, причем ширина перехода по температуре в 3 раза больше, чем для *REcoRII*. Охлаждение раствора приводит к частичной обратимости (около 40%) кривой КД.

Расчет термодинамических параметров тепловой денатурации обоих ферментов, таких, как энтальпия и энтропия, не имеет смысла из-за необратимости процесса денатурации.

Таким образом, из приведенных данных мы можем заключить, что как рестрикционная эндонуклеаза *EcoRII*, так и ДНК-метилаза *EcoRII* имеют высокое содержание упорядоченной вторичной структуры, боковые группы ароматических аминокислот жестко фиксированы в их третичных структурах. Плавление вторичной и третичной структур обоих ферментов происходит кооперативно. Причем температура и кооперативность тепловой денатурации для *REcoRII* выше, чем для *MEcoRII*.

Экспериментальная часть

Рестрикционная эндонуклеаза и ДНК-метилаза *EcoRII* получены из штамма суперпродукента [9], согласно методу [3]. Оба фермента были гомогенны по данным электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия. Перед измерением спектральных характеристик ферменты диализовали против 0,1 М калий-фосфатного буфера, рН 7,4, содержащего 0,1 мМ дитиотреит. Непосредственно перед измерением УФ- и КД-спектров растворы осветляли центрифугированием в течение 10 мин при 10 000 *g*.

УФ-спектры измеряли при 23° С на спектрофотометре Cary 219 (Varian, США). Концентрацию растворов белков определяли по содержанию азота микрометодом [10], полагая процентное содержание азота в *REcoRII* равным 17,1% и в *MEcoRII* равным 17,4%. Процентные содержания азота были вычислены из соответствующих аминокислотных последовательностей [4, 6]. Поправку на светорассеяние растворов проводили в соответствии с [11]. Все детали спектрофотометрических измерений и расчета молярных коэффициентов экстинкции описаны в работе [7].

Спектры кругового дихроизма измеряли при 10° С на дихрографе J41A (Jasco, Япония), как описано в [7]. Данные пересчитывали в единицы молярной эллиптичности ($[\theta]_{MRW}$), принимая среднюю молекулярную массу аминокислотного остатка *REcoRII* равной 111,4, *MEcoRII* — 114,3. Расчет вторичной структуры белков из КД-спектров проводили по программам [8], адаптированным для персональной ЭВМ IBM/PC/AT.

Зависимость эллиптичности ферментов при 222 нм от температуры измеряли при скорости увеличения температуры 0,9° С в минуту, как описано в [12].

Мы приносим благодарность S. Provencher (European Molecular Biology Laboratory, Heidelberg, FRG) за предоставление программ расчета вторичной структуры белков по КД-спектрам, И. А. Байкалову (Институт белка АН СССР) за адаптацию этих программ для персональной ЭВМ и Н. Б. Ильиной (Институт белка АН СССР) за определение азота.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Modrich P. // CRC Crit. Rev. Biochem. 1982. V. 13. № 3. P. 287—323.
2. Boyer H. W., Chow L. T., Dugaizyk A., Hedgpeth T., Goodman H. M. // Nature New Biol. 1973. V. 244. № 132. P. 40.
3. Косых В. Г., Пунтежис С. А., Бурьянов Я. И., Баев А. А. // Биохимия. 1982. Т. 47. № 4. С. 619—625.
4. Репик А. В., Косых В. Г., Калиман А. В., Бурьянов Я. И. // Проблемы физико-химической биологии. Пушкино, 1989. С. 115.
5. Бурьянов Я. И., Нестеренко В. Ф., Косых В. Г., Баев А. А. // Докл. АН СССР. 1981. Т. 257. № 2. С. 495—497.
6. Som S., Bhagwat A. S., Friedman S. // Nucl. Acids Res. 1987. V. 15. № 1. P. 313—332.

7. Venyaminov S. Yu., Gogia Z. V. // Eur. J. Biochem. 1982. V. 126. № 2. P. 299—309.
8. Provencher S. W., Glöckner J. // Biochemistry. 1981. V. 20. № 1. P. 33—37.
9. Kossykh V. G., Solonin A. S., Buryanov Ya. I., Bayev A. A. // Biochim. et biophys. acta. 1981. V. 655. № 1. P. 102—106.
10. Jaenicke L. // Anal. Biochem. 1974. V. 61. № 3. P. 623—627.
11. Winder A. F., Gent W. L. G. // Biopolymers. 1971. № 10. P. 1243—1251.
12. Brzeska H., Venyaminov S. Yu., Grabarek Z., Drabikowski W. // FEBS Lett. 1983. V. 153. № 1. P. 169—173.

Поступила в редакцию
31.I.1989

После доработки
21.VI.1989

UV- AND CD-SPECTRA OF RESTRICTION ENDONUCLEASE *EcoRII* AND DNA-METHYLASE *EcoRII*

VENYAMINOV S. Yu., KOSYKH V. G.*, KHOLODKOV O. A.*, BURYANOV Ya. I.*

Institute of Protein Research:

**Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms,
Academy of Sciences of the USSR, Pushchino, Moscow Region*

UV- and CD-spectra of homogeneous enzymes have been measured. Extinction coefficients estimated from the UV-spectra are 0.97 for restriction endonuclease *EcoRII* at 279.5 nm and 1.17 for DNA-methylase *EcoRII* at 279 nm. As it follows from the CD spectra, both enzymes have a well developed tertiary structure and a highly ordered secondary structure, which consists of 22% α -helices, 64% β -structure and 9% bends for *REcoRII* and of 44% α -helices, 48% β -structure and 4% bends for *MEcoRII*. Restriction endonuclease denatures at 50° C, while DNA-methylase denatures at 45° C, with partial reversibility upon cooling.