



УДК 577.152.31*302.088.5

НУКЛЕАЗЫ *Serratia marcescens*. II#. АНАЛИЗ ПЕРВИЧНЫХ СТРУКТУР ПУТЕМ ПЕПТИДНОГО КАРТИРОВАНИЯ В КОМБИНАЦИИ С ПЛАЗМЕННО-ДЕСОРБЦИОННОЙ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЕЙ

© 1995 г. Ю. Педерсен, М. Н. Филимонова*, П. Роепсторф**, К. Бидерман

Кафедра биотехнологии Датского технического университета, г. Лингби;

*Кафедра микробиологии Казанского государственного университета, 420008, Казань, ул. Ленина, 18;

**Кафедра молекулярной биологии Университета г. Оденсе

Поступила в редакцию 21.04.94 г. После доработки 26.08.94 г.

Плазменно-десорбционной масс-спектрометрией (ПДМС) протеолитических пептидов, выделенных обращенно-фазовой ВЭЖХ, полностью охарактеризованы первичные структуры нуклеаз Sm1, Sm2, Sm3, продуцируемых бактерией *Serratia marcescens*. Изоформы разделяли анионообменной хроматографией на колонке с DEAE-целлюлозой и подвергали гидролизу лизинспецифичной эндопротеиназой Lys-C. Сравнительный анализ пептидов, идентифицированных ПДМС, показал, что все три нуклеазы являются N-концевыми вариантами одного и того же белка: Sm2 представляет собой "зрелую" форму белка, в Sm1 и Sm3 отсутствуют 3 и 1 N-концевые аминокислоты соответственно.

Ключевые слова: изоформы ферментов; белки, структура первичная; масс-спектрометрия плазменно-десорбционная, *Serratia marcescens*.

Начиная с 60-х годов внеклеточная нуклеаза *Serratia marcescens* (КФ 3.1.30.2), гидролизующая как ДНК, так и РНК с образованием нуклеотидов низкой степени полимерности, является объектом различного рода исследований. Определена полная нуклеотидная последовательность гена нуклеазы с последующим проведением его клонирования и экспрессии в клетках *S. marcescens* и *E. coli* [2 - 6]. Подробно изучены физико-химические и биохимические свойства фермента [4, 7 - 12]. Проведен первичный кристаллографический анализ нуклеазы *S. marcescens* [13, 14].

Поскольку препарат эндонуклеазы *S. marcescens*, секретирующийся различными штаммами бактерий, содержит по меньшей мере две изоформы [9, 11, 12, 15, 16], целью настоящей работы является проведение сравнительного анализа первичных структур изоформ. Поставленная цель была достигнута путем пептидного картирования изоферментов в комбинации с плазменно-десорбционной масс-спектрометрией пептидов.

Препараты эндонуклеазы выделяли из культуральных жидкостей, полученных в результате проведения двух отдельных ферментаций *S. marcescens* В ЮМ1 с использованием описанной ранее

процедуры, в основе которой лежит трехстадийная очистка с применением ионообменной хроматографии на DEAE- и фосфоцеллюлозе [10]. Полученные препараты разделяли на изоформы анионообменной хроматографией на DEAE-целлюлозе DE-52 (Whatman) с элюцией в линейном градиенте рН (8.25 - 7.20) 50 мМ трис-НСI-буфера [12].

Изоэлектрическое фокусирование выделенных изоформ показало, что из сульфат-аммонийной фракции одной из ферментаций вместе с

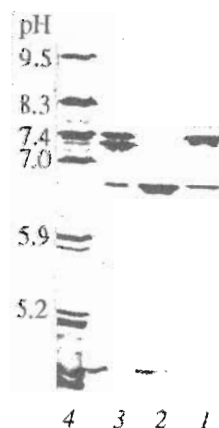


Рис. 1. Изоэлектрофокусирование изоформ нуклеазы в агарозном геле. 1 - Sm1; 2 - Sm2; 3 - Sm1/Sm2; 4 - маркерные белки.

Сообщение I см. [1].

Использованные сокращения: ПДМС - плазменно-десорбционная масс-спектрометрия, TFA - трифторуксусная кислота.

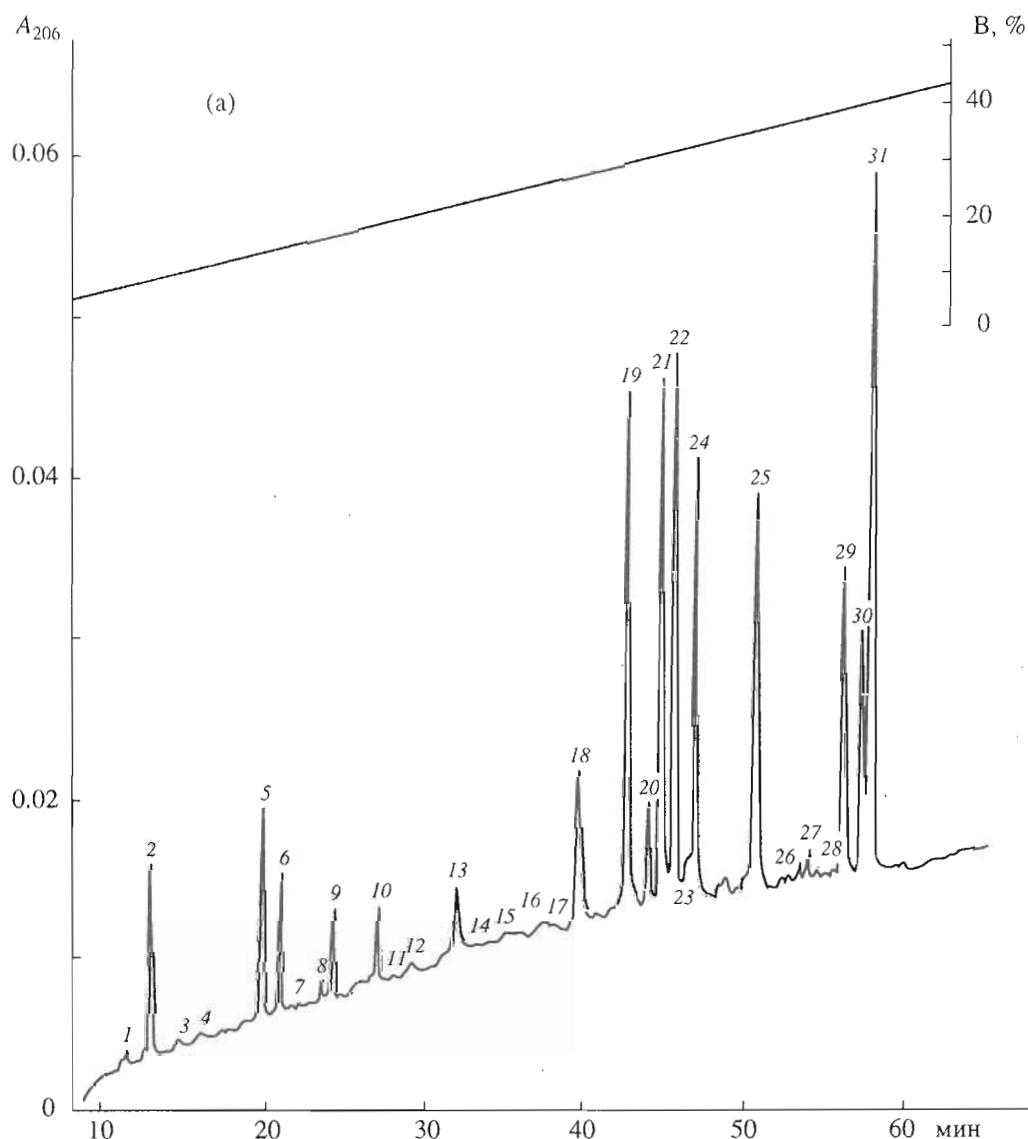


Рис. 2. Фракционирование пептидов, полученных протеолизом изоформ *Sm2* (а) и смеси *Sm1* и *Sm3* (б) нуклеазы *S. marcescens* В10М1 эндопротеиназой Lys-С, обращенно-фазовой ВЭЖХ на колонке (4,6 × 250 мм) с нуклеосилом C₁₈. Образцы наносили в буфере А, содержащем 0,1% ТФА; пептиды элюировали градиентом концентрации буфера В (ацетонитрил, 0 - 48%) в 0,1% ТФА со скоростью 1 мл/мин.

изоформой *Sm1* выделялась ранее не охарактеризованная нуклеаза, имеющая изоэлектрическую точку (pI) 7,3, отличную от изоэлектрических точек двух известных нуклеаз – *Sm1* и *Sm2* (pI 7,4 и 6,8 соответственно [12, 17]) (рис. 1). Изоформа была названа *Sm3* и подвергнута структурному анализу параллельно с нуклеазами *Sm2* и *Sm1*.

Первый этап характеристики трех изоферментов – разделение продуктов протеолиза эндопротеиназой Lys-С, специфичной к пептидной связи Lys-Хаа [18], обращенно-фазовой ВЭЖХ – выявил некоторые различия в пептидных картах изоформ. Так, пики 22 и 9 (рис. 2а), заметные в хроматограмме *Sm2*, отсутствовали в хроматографическом профиле смеси изоформ *Sm2* и *Sm3*

(*Sm1/Sm3*) (рис. 2б). Напротив, пики 1, 3, 7 и 8 и первое плечо пика 19 хроматограммы *Sm1/Sm3* не были выявлены для изоформы *Sm2*. Хроматографический профиль пептидов *Sm1* отдельно не показан, поскольку он идентичен хроматограмме *Sm1/Sm3* (за исключением небольших отличий в высоте пиков).

Последующий анализ пептидов с помощью ПДМС подтвердил предполагаемые различия изоформ (рис. 3, таблица). Так, пептид пика 22 нуклеазы *Sm2* с молекулярной массой 3837,5 полностью отсутствовал в гидролизатах *Sm1* и *Sm1/Sm3* и по массе соответствовал N-концевому пептиду Asp¹-Lys³⁷. Вместо этого в гидролизатах *Sm1* и в меньшей степени *Sm1/Sm3* был выявлен другой

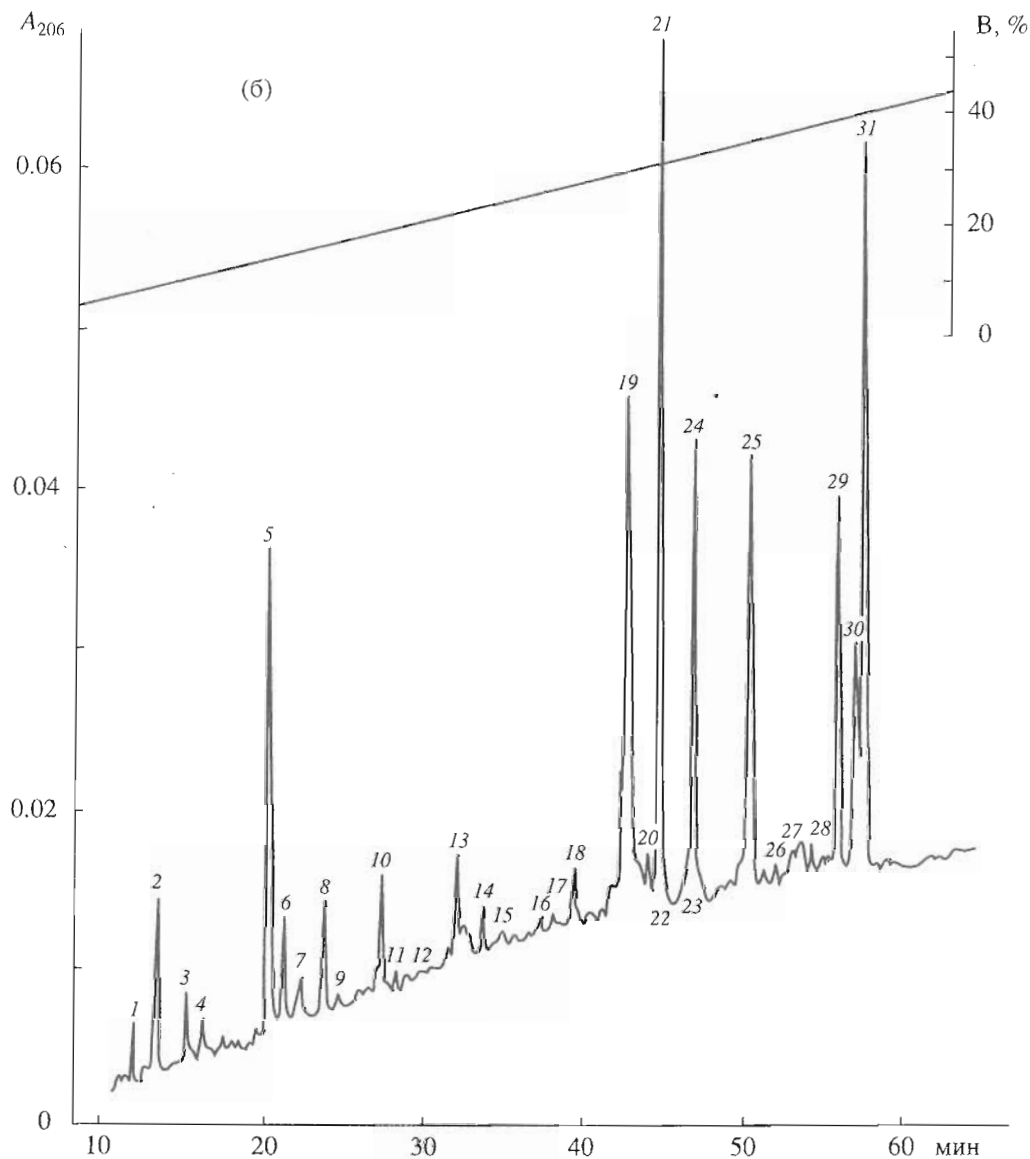


Рис. 26.

пептид, дававший значительное плечо в пике 19 и имевший молекулярную массу 3508.4. Данный пептид соответствовал фрагменту $\text{Glu}^4\text{-Lys}^{37}$, рассчитанному для N-концевого пептида, и свидетельствовал в пользу структурных различий изоформ Sm1 и Sm2 . Кроме того, для вещества пика 20, представленного на хроматограмме $\text{Sm1}/\text{Sm3}$, был определен молекулярный ион с m/z 3721.8, соответствовавший иному варианту N-концевого пептида – $\text{Thr}^2\text{-Lys}^{37}$. Подобный ион отсутствовал в масс-спектре пептидов пика с аналогичным временем элюции при хроматографии гидролизата нуклеазы Sm2 . Вместо него был найден молекулярный ион с m/z 2494.0, соответствующий другому варианту N-концевого пептида – $\text{Asp}^1\text{-Arg}^{25}$, полученному, очевидно, в результате неспецифического расщепления по Arg^{25} с C-конца. Ни один

из этих двух молекулярных ионов не был найден для пика 20 хроматограммы Sm1 ; вместо них был обнаружен ион с m/z 2206.7, предварительно соотношенный с последовательностью $\text{Val}^{85}\text{-Leu}^{105}$, выявленный также для вещества пика 20 изоформы Sm2 . Таким образом, изофермент Sm3 отличался по структуре как от Sm1 -, так и от Sm2 -изоформ.

Однако наряду с выявленными различиями проведенный анализ показал, что большинство пептидов, идентифицированных для нуклеазы Sm2 , присутствовало в продуктах протеолиза изоформ Sm1 и смеси изоформ $\text{Sm1}/\text{Sm3}$.

Многие из продуктов минорных пиков на представленных хроматограммах, так же как и компоненты, элюированные вместе с основными пептидами в больших пиках, были идентифицированы как фрагменты неспецифического гидролиза.

Молекулярные массы пептидов из гидролизатов нуклеаз *Sm2*, *Sm1* и смеси *Sm1/Sm3*, определенные с помощью ПДМС. (Для сравнения представлены рассчитанные на основании аминокислотной последовательности молекулярные массы ожидавшихся пептидов)

Номер пика при ВЭЖХ	Участок нуклеазы	Молекулярная масса пептида			
		Рассчитанная	Измеренная для гидролизата		
			<i>Sm2</i>	<i>Sm1/Sm3</i>	<i>Sm1</i>
22	1 - 37	3838.1 ^b	3837.5		
20	1 - 25	2492.7 ^{a, b}	2494.0		
20	2 - 37	3723.1 ^{a, b}		3721.8	
19	4 - 37	3508.8 ^{a, b}		3508.5	3508.4
18	4 - 25	2163.4 ^{a, b}		2163.5	2163.8
10	26 - 37	1363.5 ^a	1363.4	1363.7	1362.5
24	38 - 48	1349.6	1350.3	1349.7	1349.7
18	40 - 48	1131.3 ^a	1132.3		
4	45 - 48	497.9 ^a	498.4	498.4	498.4
2	49 - 55	674.7	675.3	675.4	675.4
9	56 - 60	703.8	704.6		
21	61 - 84	2171.6	2371.5	2371.0	3271.6
2	85 - 90	710.8 ^a		711.5	711.5
20	85 - 105	2208.4 ^a	2206.6		2206.7
31	85 - 115	3367.7	3368.0	3367.3	3366.3
10	107 - 115	1063.2 ^a	1064.3	1063.4	1064.0
19	116 - 132	2016.2	2016.1	2016.0	2016.4
20	133 - 143	1251.4 ^a		1252.3	1252.2
25	133 - 156	2700.1	2699.5	2699.2	2699.0
6	157 - 162	642.8	643.6	643.4	643.6
7	153 - 162	1073.3 ^a		1073.3	1072.9
18	163 - 172	1173.3	1174.3		
5	171 - 172	332.4 ^a	333.2	333.1	333.1
13	163 - 170	859.0 ^a	859.4	859.6	859.9
8	163 - 168	624.7 ^a		625.7	625.3
18	173 - 184	1324.5 ^a	1325.3	1325.2	1325.0
30	173 - 196	2721.1	2720.8	2720.0	2720.7
29	197 - 212	1856.1 ^b	1856.4	1856.6	1857.1
13	205 - 213	1088.2 ^a	1089.3	1089.2	1088.9
31	213 - 231	2053.4	2053.6	2053.2	2053.1
	232 - 233	233.3			
29	234 - 244	1142.4 ^b	1142.9	1143.2	1142.4
	197 - 212				
	$\begin{matrix} S \\ \diagdown \\ 234 - 244 \end{matrix}$	2996.5	2998.1	2998.4	2997.2
	197 - 212				
	$\begin{matrix} S \\ \diagdown \\ 232 - 244 \end{matrix}$	3212.0	3213.7	3213.5	3212.9
	245	132.1			

^a Пептиды неспецифического гидролиза.

^b Расчеты производились на основании предположения существования свободной SH-группы.

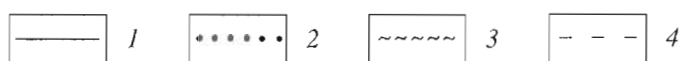
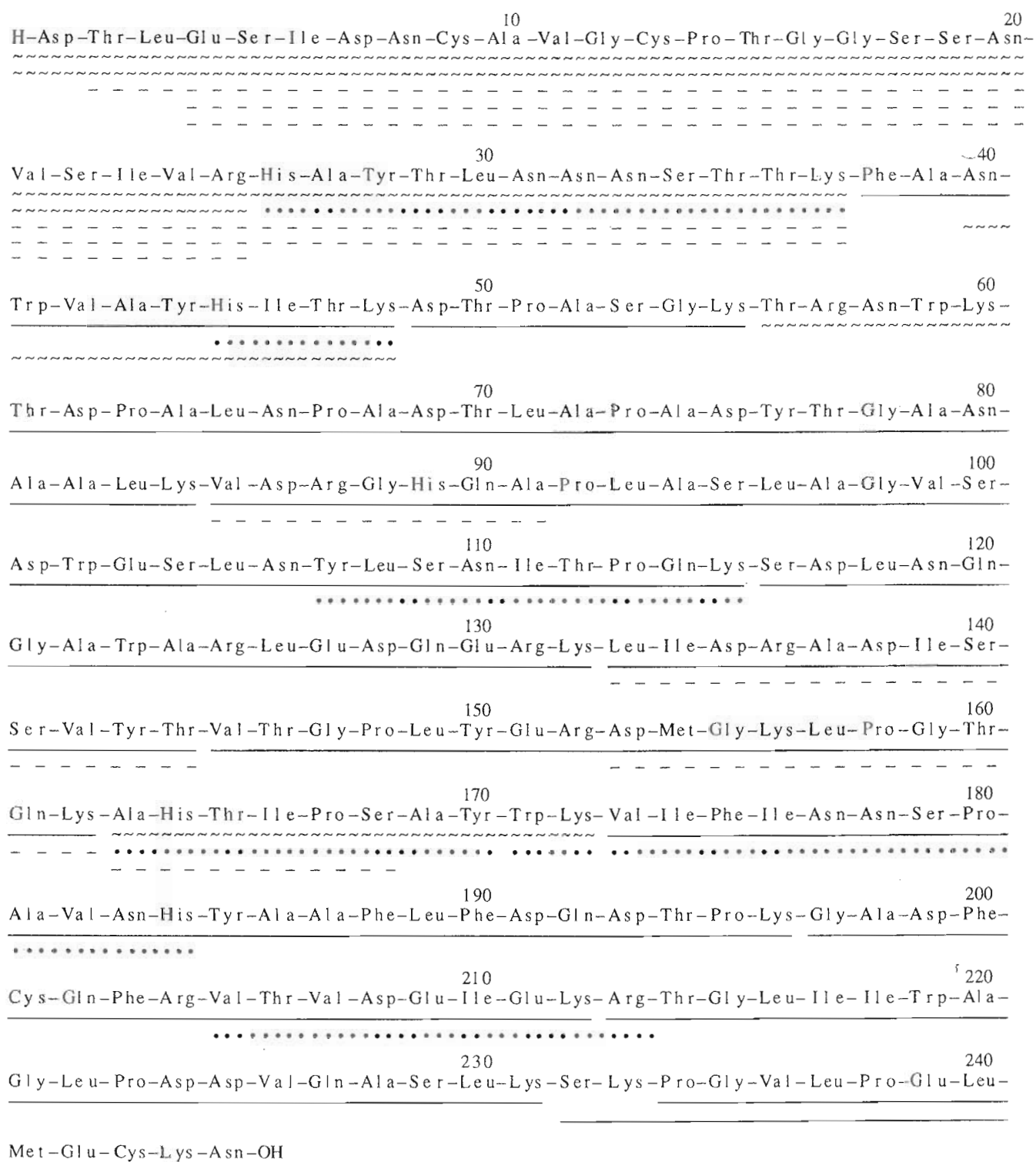


Рис. 3. Аминокислотная последовательность изоформ нуклеазы *S. marcescens*, определенная методом плазменно-десорбционной масс-спектрометрии их протеолитических пептидов. Обозначения пептидов изоформ *S. marcescens* В10М1: 1 – образовавшиеся в результате специфического гидролиза эндопротеиназой Lys-C изоформ *Sm2*, *Sm1/Sm3* и *Sm1*; 2 – образовавшиеся в результате неспецифического гидролиза изоформ *Sm2*, *Sm1/Sm3* и *Sm1*; 3 – выявленные только в нуклеазе *Sm2*; 4 – найденные только в *Sm1* и *Sm1/Sm3*.

Так, пик 18, представленный на хроматограмме нуклеазы *Sm2*, содержал пептид с молекулярной массой 1174.3, что соответствовало последовательности Ala¹⁶³-Lys¹⁷². Продукты неспецифического расщепления этого пептида (Ala-His-Thr-Ile-Pro-Ser-Ala-Tyr-Trp-Lys) по Tyr¹⁷⁰ с С-конца с молекулярными массами 859.4 и 334.1 были найдены в пиках 13 и 5 соответственно. В гидролизатах *Sm1* и *Sm1/Sm3* последовательность Ala¹⁶³-Lys¹⁷² была представлена лишь двумя субфрагментами и дополнительным пептидом с молекулярной массой 625.7. Идентичность последнего пептиду Ala¹⁶³-Ser¹⁶⁸ была подтверждена его N-концевым анализом.

В пике 9, представленном на хроматограмме *Sm2*, был определен один из ожидавшихся пептидов, Thr⁵⁶-Lys⁶⁰, с молекулярной массой 704.6. Аналогичный пептид не был выявлен в продуктах гидролиза *Sm1* и *Sm1/Sm3*, в том числе и в пиках 1, 3, 7, 8. Поскольку некоторая степень неспецифического гидролиза протеиназой Lys-C наблюдалась для всех препаратов, выделенных из *S. marcescens* В10М1, мы предполагаем, что отсутствие пептидной фракции Thr⁵⁶-Lys⁶⁰ в гидролизате *Sm1* и *Sm1/Sm3* могло быть обусловлено полным протеолизом данного фрагмента. Все идентифицированные участки неспецифического расщепления лизиновой протеиназой Lys-C представлены в таблице и на рис. 3. Однако остается неясным, отражает ли это недостаточную специфичность фермента Lys-C или его некоторое загрязнение другими протеиназами.

Пик 29 на хроматограммах всех исследуемых изоформ, так же, впрочем, как и пик 27, подтвердил, что в С-концевой области между Cys²⁰¹ и Cys²⁴³ имеется дисульфидный мостик, поскольку идентифицированный молекулярный ион с *m/z* 2998.1 был выявлен как два цистеинсодержащих пептида – Gly¹⁹⁷-Lys²¹² и Pro²³⁴-Lys²⁴⁴ (с молекулярными массами 1856.4 и 1142.9 соответственно), связанных дисульфидной связью. Другой известный S-S-мост [4], расположенный между остатками цистеинов 9 и 13, находится внутри единого фрагмента – N-концевого пептида Asp¹-Lys³⁷. В связи с этим он оказался сложным для подтверждения. Кроме того, точность плазменно-десорбционной масс-спектрометрии недостаточна для того, чтобы однозначно определить присутствие одного дисульфидного мостика или двух свободных SH-групп (разница в массе – 2 единицы) при молекулярной массе свыше 2000 [19].

Таким образом, все пептиды, ожидавшиеся на основании специфичности лизиновой протеиназы Lys-C, гидролизующей пептидные связи по С-концевому лизину, были найдены и подтверждены в нуклеазах *S. marcescens* В10М1, за исключением пептида Ser²³²-Lys²³³ и С-концевой аминокислоты Asp²⁴⁵. Однако выявление аминокислотной последовательности Ser²³²-Lys²³³ в составе

пептида Ser²³²-Lys²⁴⁴, появившегося, по-видимому, за счет отсутствия расщепления по связи Lys²³³-Pro²³⁴ и связанного дисульфидным мостиком с пептидом Gly¹⁹⁷-Lys²¹² (пик 27), служит косвенным доказательством наличия данного фрагмента в аминокислотной последовательности нуклеаз. Кроме этого, несмотря на то что С-концевой пептид, представленный одной-единственной аминокислотой (Asp²⁴⁵), не найден, в соответствии с нуклеотидной последовательностью структурного гена нуклеазы [2] мы заключаем, что это Asp. Данный остаток не был обнаружен ни в одном из хроматографических пиков, в связи с чем мы предполагаем, что он элюировался в свободном объеме во время хроматографического разделения.

Таким образом, комбинирование протеолитического гидролиза с плазменно-десорбционной масс-спектрометрией оказалось быстрым и полезным методом для выявления различия изоформ нуклеазы *S. marcescens*.

Настоящее исследование показало, что единственным отличием первичных структур изоформ нуклеазы *S. marcescens* В10М1 является гетерогенность в N-концевой аминокислотной последовательности. Так, было выявлено, что в одной из изоформ – *Sm3* – недостает первого N-концевого остатка аминокислоты Asp, в другой изоформе – *Sm1* – отсутствуют первые три аминокислотных остатка – Asp-Thr-Leu; структура нуклеазы *Sm2* полностью соответствовала нуклеотидной последовательности структурного гена, кодирующего этот белок.

Некоторые различия в пептидных картах *Sm1* и *Sm2*, ранее выявленные после триптического гидролиза изоформ и интерпретированные как различия, имеющие во внутренней структуре белка [12, 17], не были подтверждены настоящим исследованием, и, таким образом, было предположено, что обнаруженные ранее различия были обусловлены вариациями в процессе триптического гидролиза или, возможно, небольшими примесями N-концевых пептидов из других изоформ, таких, как *Sm3*.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Изоэлектрофокусирование проводили так, как описано Бидерман и Нильсеном [20], на приборе "Мультифор II" (Pharmacia, LKB), используя 0.3-мм 1% агарозные гели (марки IEF, Pharmacia, LKB, Allerod, Дания). Для установления pH-градиента вносили амфолины – Сервалиты (Serva, Германия), pH 4 - 6 и 3 - 10 – в пропорции 1 : 3. pH в геле определяли с помощью смеси pI-маркерных тест-белков № 9 (Serva).

Протеолитический гидролиз лизинспецифичной эндопротеиназой Lys-C (Boehringer-Mannheim, Германия) проводили в течение 18 ч при 36°C и

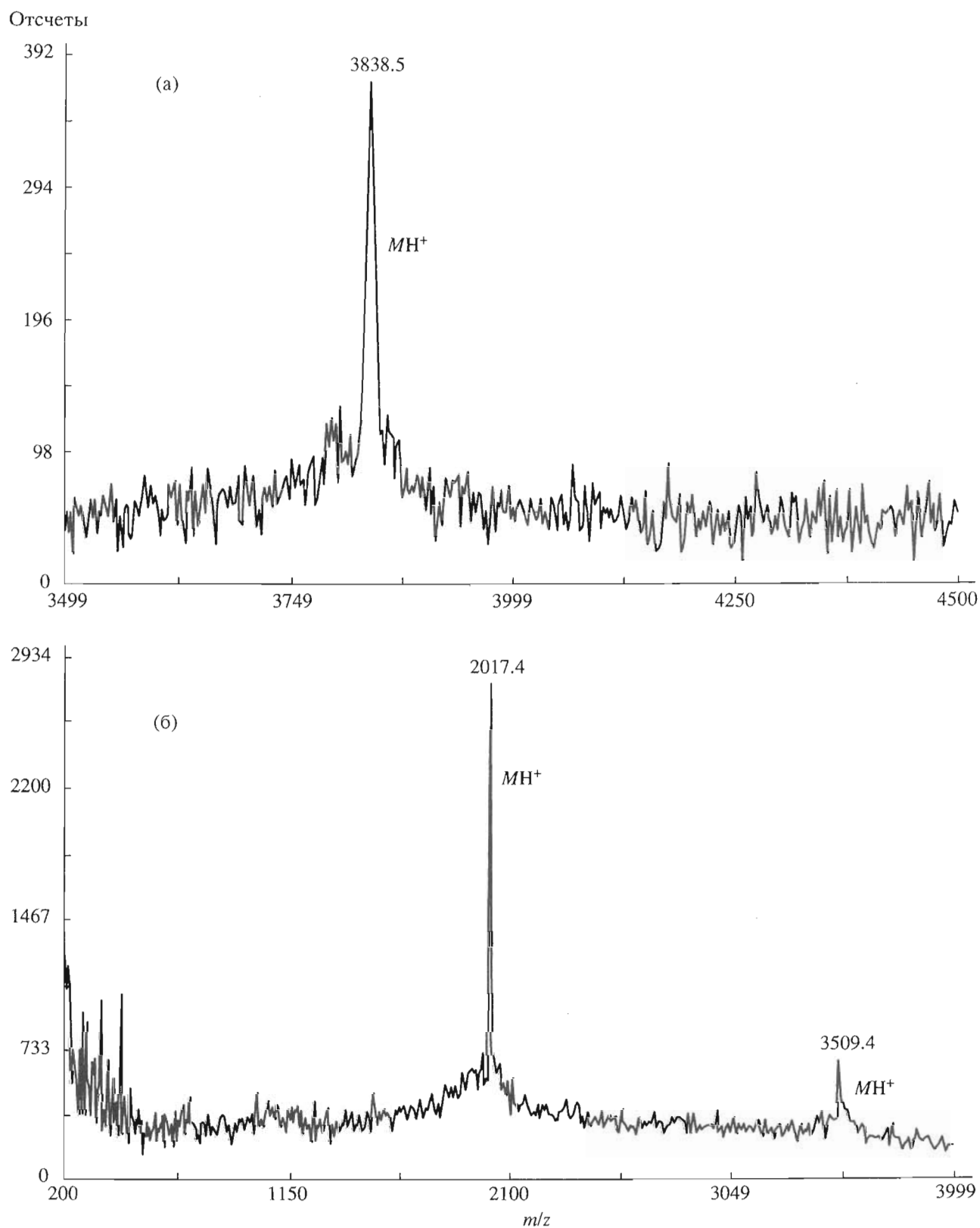


Рис. 4. Плазменно-десорбционные масс-спектры N-концевых пептидов изоформ нуклеазы *S. marcescens* B10M1: а – молекулярный ион Asp¹-Lys³⁷ (m/z 3838.5) изоформы Sm2 (пик 22, рис. 2а); б – молекулярные ионы, выявленные в пике 19 изоформы Sm1: m/z 3509.4 – Glu⁴-Lys³⁷; m/z 2017.4 – Ser¹¹⁶-Lys¹³²; в – молекулярные ионы смеси изоформ Sm1/Sm3 (рис. 2б): m/z 3722.8 – Thr²-Lys³⁷ (пик 20); m/z 2372.0 – Thr⁶¹-Lys⁸⁴ (пик 21).

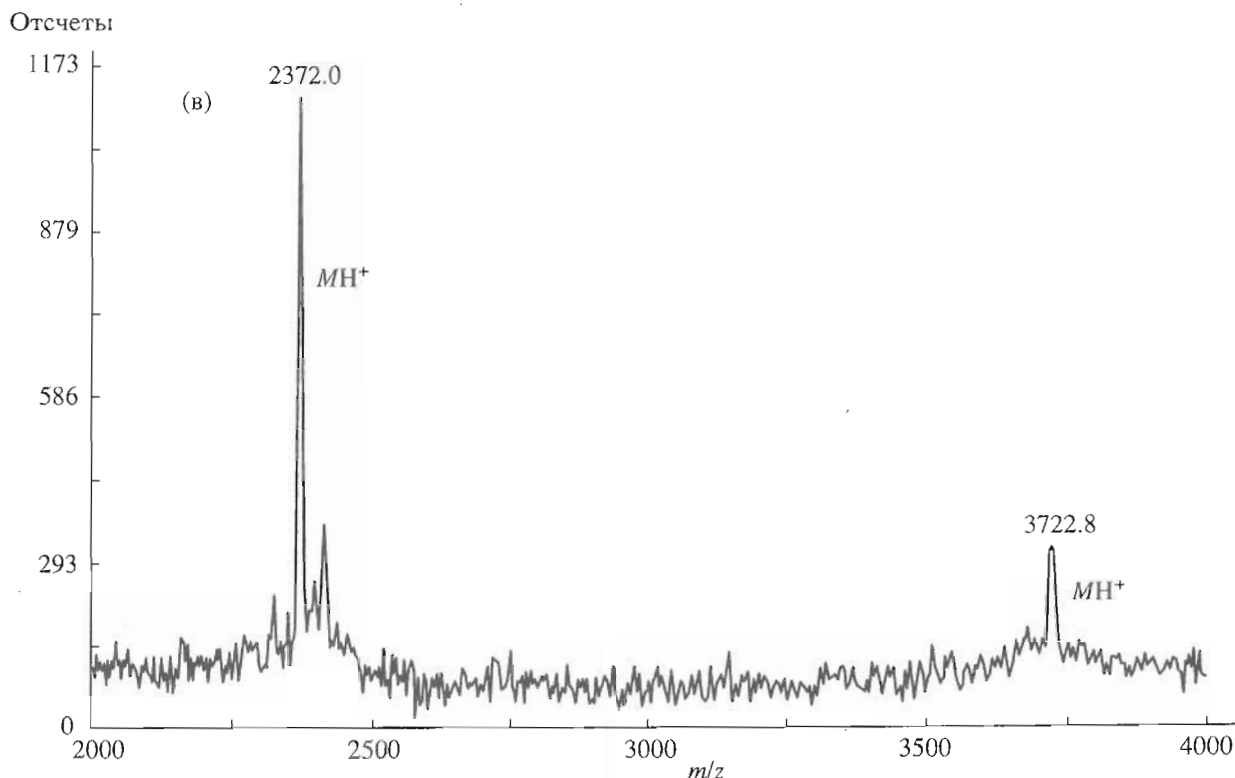


Рис. 4в.

соотношении фермент-субстрат 1 : 50 в 25 мМ трис-НСl-буфере (рН 8.5), содержащем 1 мМ EDTA, и прекращали добавлением равного объема TFA с последующим выпариванием вещества досуха в вакуумной центрифуге (Heto). Полученные пептиды разделяли обращенно-фазовой ВЭЖХ (рис. 2) на нуклеосиле C₁₈ (Knauer, Берлин). Фракции пептидов высушивали досуха в вакуумной центрифуге (Heto).

Масс-спектры выделенных пептидов определяли на ²⁵²Cf-плазменно-десорбционном масс-спектрометре (Bio-Ion 20 Nordic, Швеция). Каждый пептид растворяли в 0.1% TFA и наносили на нитроцеллюлозную матрицу, приготовленную электропылением нитроцеллюлозы на алюминиевую фольгу (Bio-Rad Laboratories, США). Высушенные на матрице образцы анализировали в режиме положительного ионного поля. Спектры собирали в течение 10⁶ расщеплений (примерно 15 мин), так, как было описано в работе [21].

Идентификацию пептидов выполняли с помощью поисковой компьютерной программы [22], которая соотносила полученные массы пептидов с возможными, определенными из аминокислотной последовательности нуклеазы.

Выполнение данной работы стало возможным благодаря поддержке Центра биотехнологических процессов при Департаменте биотехнологии Технического университета Дании. Авторы рабо-

ты выражают искреннюю благодарность Петеру Хойрепу за определение N-концевых аминокислотных последовательностей, Метте Б. Эггеде за высококвалифицированную техническую помощь, Николаю Филимонову за техническую помощь, оказанную в процессе оформления статьи. Поддержку Клауса Эмборга на всех стадиях выполнения данной работы трудно переоценить.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Педерсен Ю., Андерсен Ж., Роенсторф П., Филимонова М.Н., Бидерман К. // Биооргани. химия. 1995. Т. 21. № 5. С. 330 - 335.
2. Ball T.K., Saurugger P.N., Benedik M.J. // Gene. 1987. V. 57. P. 183 - 192.
3. Ball T.K., Wasmuth C.R., Braunagel S.C., Benedik M.J. // J. Bacteriol. 1990. V. 172. P. 342 - 349.
4. Biedermann K., Jepsen P.K., Riise E., Svendsen I. // Carlsberg. Res. Commun. 1989. V. 54. P. 17 - 27.
5. Clegg S., Allen B.L. // FEMS Microbiol. Lett. 1985. V. 27. P. 257 - 262.
6. Emborg C., Jepsen P.K., Biedermann K. // Biotechnol. Bioeng. 1989. V. 33. P. 1393 - 1399.
7. Nestle M., Roberts W. // J. Biol. Chem. 1969. V. 19. P. 5213 - 5223.
8. Лецинская И.Б., Балабан Н.П., Егорова Г.С., Тяняшин В.И., Третьяк Т.М. // Биохимия. 1974. Т. 39. С. 116 - 122.

9. Yonemura K., Matsumoto K., Maeda H. // *J. Biochem.* 1983. V. 93. P. 1287 - 1295.
10. Филимонова М.Н., Балабан Н.П., Шарипова Ф.Р., Лецинская И.Б. // *Биохимия.* 1980. Т. 45. С. 2096 - 2103.
11. Филимонова М.Н., Баратова Л.А., Воспельникова Н.Д., Желтова А.О. // *Биохимия.* 1981. Т. 46. С. 1660 - 1665.
12. Филимонова М.Н., Дементьев А.А., Лецинская И.Б., Бакулина Г.Ю., Шляпников С.В. // *Биохимия.* 1991. Т. 56. С. 508 - 513.
13. Bannikova G.E., Blagova E.V., Dementiev A.A., Morgunova E.Yu., Mikhailov A.M., Shlyapnikov S.V., Varlatov V.P., Vainshtein B.K. // *Biochem. Int.* 1991. V. 24. P. 813 - 822.
14. Miller M.D., Benedik M.J., Sullivan N.S., Shipley N.S., Krause K.L. // *J. Mol. Biol.* 1991. V. 222. P. 27 - 30.
15. Biedermann K., Fiedler H., Larsen B.S., Riise E., Emborg C., Jepsen P.K. // *Appl. Environ. Microbiol.* 1990. V. 56. P. 1833 - 1838.
16. Biedermann K., Jepsen P.K., Pedersen J., Nielsen B.R. // *Separation in Biotechnology* / Ed. Pyle D.L. Amsterdam: Elsevier, 1991. P. 462 - 471.
17. Банникова Г.Е., Благова Е.В., Варламов В.П., Моргунова Е.Ю., Дементьев А.А., Шляпников С.В. // *Биоорг. химия.* 1990. Т. 16. С. 1678 - 1682.
18. Boehringer Mannheim Biochemica. *Biochem. Service.* 1990. P. 1 - 3.
19. Sorensen H.H., Thomsen J., Bayne S., Hojrup P., Roepstorff P. // *Biomed. Environ. Mass Spectrom.* 1990. V. 19. P. 713 - 720.
20. Biedermann K., Nielsen B.R. // *Pharmaceut. Technol. Int.* 1990. V. 2. P. 37 - 41.
21. Sundquist B., Kamensky I., Hakonsson O., Kjellberg J., Salehpour M., Widdiyasekera S., Fohlman J., Petersson P.A., Roepstorff P. // *Biomed. Mass. Spectrom.* 1984. V. 11. P. 242 - 257.
22. Hojrup P. // *IFOS V, Proceedings of the Fifth Symposium on Ion Formation from Organic Solids* / Eds Hedin A., Sundqvist B.U.R., Benninghoven A. Chichester: Wiley, 1990. P. 61 - 65.

Serratia marcescens Nucleases. Part II#: Analysis of Primary Structures by Peptide Mapping in Combination with Plasma Desorption Mass Spectrometry

J. Pedersen, M. N. Filimonova*, P. Roepstorff**, and K. Biedermann

Department of Biotechnology, Danish Technical University, Lyngby, Denmark

* *Department of Microbiology, Kazan' State University, ul. Lenina 18, Kazan', 420008 Tatarstan, Russia*

** *Department of Molecular Biology, Odense University, Odense, Denmark*

Abstract – The primary structures of nucleases *Sm1*, *Sm2*, and *Sm3* produced by *Serratia marcescens* were completely characterized using plasma desorption mass spectrometry (PDMS) of proteolytic peptides isolated by reverse-phase HPLC. The isoforms were separated by anion-exchange chromatography on DEAE cellulose and subjected to hydrolysis by the lysine-specific endoproteinase Lys-C. Comparative analysis of the peptides identified by PDMS showed that all three nucleases are N-terminal variants of the same protein: *Sm2* represents a "mature" protein form, whereas *Sm1* and *Sm3* lack three and one N-terminal amino acid residues, respectively.

Key words: enzyme isoforms, proteins, primary structure, plasma desorption mass spectrometry, *Serratia marcescens*.

Part I see [1].