

(«Phagmascia») фермент *BamHI* имеет молекулярную массу 66000 и состоит из четырех субъединиц с молекулярной массой 16500 каждая.

Таким образом, результаты наших исследований свидетельствуют о том, что рестрикционные эндонуклеазы *BamHI* и *BnaI*, обладающие одинаковой специфичностью, отличаются друг от друга по ряду физико-химических свойств. Эти белки имеют разные молекулярные массы, отличны по стабильности и требуют различной ионной силы для гидролиза субстрата. Дальнейшее сравнительное изучение рестриктаз с одинаковой субстратной специфичностью позволит расширить наши представления о явлении изоэномерии.

SOME DIFFERENCES BETWEEN *BAMHI* AND *BNAI*, THE RESTRICTASES WITH THE SAME SPECIFICITY

E. L. Kim, O. P. Makhovich, S. S. Maliuta

Institute of Molecular Biology and Genetics,
Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Kiev

S u m m a r y

The restriction endonuclease *BnaI*, being *BamHI* true isoshisomer, is isolated from *Bac. natto* B3364 strain. Its molecular weight, stability and optimal reaction conditions are studied. Comparative investigations have shown that according to these physicochemical characteristics the *BamHI* and *BnaI* enzymes differ from each other in spite of their analogous specificity.

1. Kessler Ch., Neumaier P. S., Wolf W. Recognition sequences of restriction endonucleases and methylases — a review // Gene.—1986.—33, N 1.— P. 1—101.
2. Wilson G. A., Young F. E. Isolation of a sequence-specific endonuclease (*BamHI*) from *Bacillus amyloliquefaciens* H. // J. Mol. Biol.—1975.—97, N 1— P. 123—125.
3. Ким Э. Л., Малиута С. С. *BnaI* — новый изоэномер рестриктазы *BamHI* // Биотехнология.—1986.— № 4.— С. 24—27.
4. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature.—1970.—227, N 5259.— P. 680—685.
5. Gooderman K., Clifton N. J. High-sensitivity silver staining of proteins following PAAG electrophoresis // Meth. Mol. Biol.—1984.—1.— P. 113—118.

Ин-т молекуляр биологии
и генетики АН УССР, Киев

Получено 07.08.87

УДК 577 15/17

МОЖНО ЛИ «ПРИВИТЬ» К БЕЛКОВОЙ ГЛОБУЛЕ «ЧУЖОЙ» АКТИВНЫЙ ЦЕНТР?

А. В. Финкельштейн

Известно, что белки с совсем разной первичной структурой и различной пространственной организацией могут иметь одинаковые или сходные биохимические функции [1]. Классическим примером являются сериновые протеазы— белки с различающейся архитектурой (рис. 1), но одинаковой конфигурацией ключевых боковых групп в каталитическом центре (рис. 2).

Можно ли белковую молекулу уподобить каркасу с закрепленным на нем активным центром [5] или в катализе активно участвует вся белковая глобула [6]? Ответ на этот вопрос имел бы большое значение не только для искусственного «конструирования» белковых молекул, но и для проблемы возникновения функционирующих белков в природе.

С появлением белковой инженерии [7] наметилась возможность экспериментального подхода к таким, прежде сугубо теоретическим, вопросам [8].

Если белковая глобула является только твердым «фундаментом» для активного центра, то на ней можно создать и другой активный центр (с новой, «привитой» функцией) путем направленных точечных замен нескольких поверхностных аминокислотных остатков.

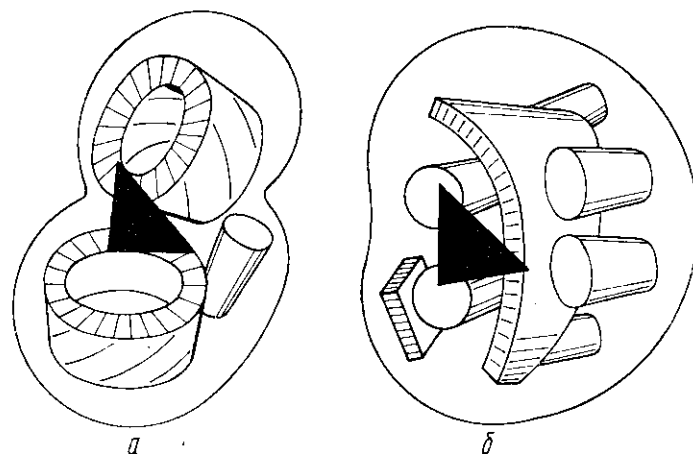


Рис. 1. Схема строения двух разных сериновых протеаз, трипсина (а) и субтилизна (б). На фоне общего контура глобул показаны α -спирали (тонкие цилиндры), β -листы и β -цилиндры; район активного центра выделен черным треугольником
Fig. 1. The architecture of the two different serine proteases, trypsin (a) and subtilisin (b). The α -helices (thin cylinders), β -sheets and β -barrels are shown at the background of globule contours. The active site region is marked by black triangle

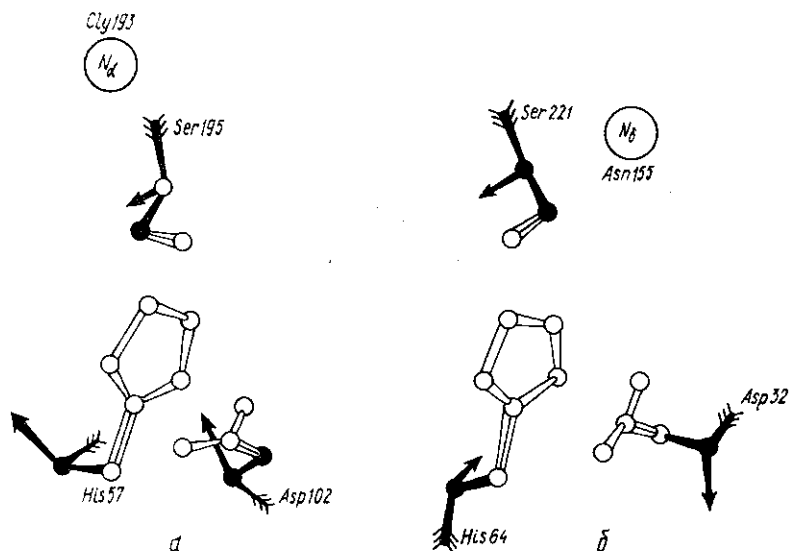


Рис. 2. Схема строения каталитических центров трипсина [2] (а) и субтилизна [3] (б). Черным выделены фрагменты главной цепи (вплоть до C_{β} -атомов); ход главной цепи показан стрелками, ковалентные связи C_{β} - и γ -атомов — тройными линиями. Кружком отмечено расположение NH-группы, существенной [1, 4] для эффективности реакции. Видно, что инвариантно только расположение боковых групп системы переноса заряда (Ser; His; Asp)
Fig. 2. The schemes of the catalytic sites of trypsin [2] (a) and subtilisin [3] (b). The backbone fragments (up to C_{β} -atoms) are blacked; the arrows indicate backbone direction; the triple lines show the covalent bonds between C_{β} - and γ -atoms. The circle marks the position of the NH-group which is important [1, 4] for the activity level. It is seen that invariant is only the position of the side chains of the charge relay system (Ser; His; Asp)

Особенно удобно проводить такие замены в местах глобулы, где пространственное расположение се аминокислотных остатков уже «напоминает» желаемый активный центр (рис. 3). Ключевой элемент «сходства» — расположение в пространстве β - и

γ -атомов — в значительной мере определяющее позицию химически активных концов боковых цепей.

Проведенный при помощи А. Г. Головинской и С. И. Фроловой анализ пространственных структур ряда белков, взятых из Банка белковых структур [9], показал, что такие «потенциальные активные центры» довольно часто встречаются на поверхности белковых глобул.

Так, на поверхности дигидрофолатредуктазы [10] найдена одна (37; 57; 35), а на поверхности лизоцима фага T4 [11] — две (148; 10; 101) и (8; 29; 69) группировки из трех аминокислотных остатков, сходные (с точки зрения пространственного

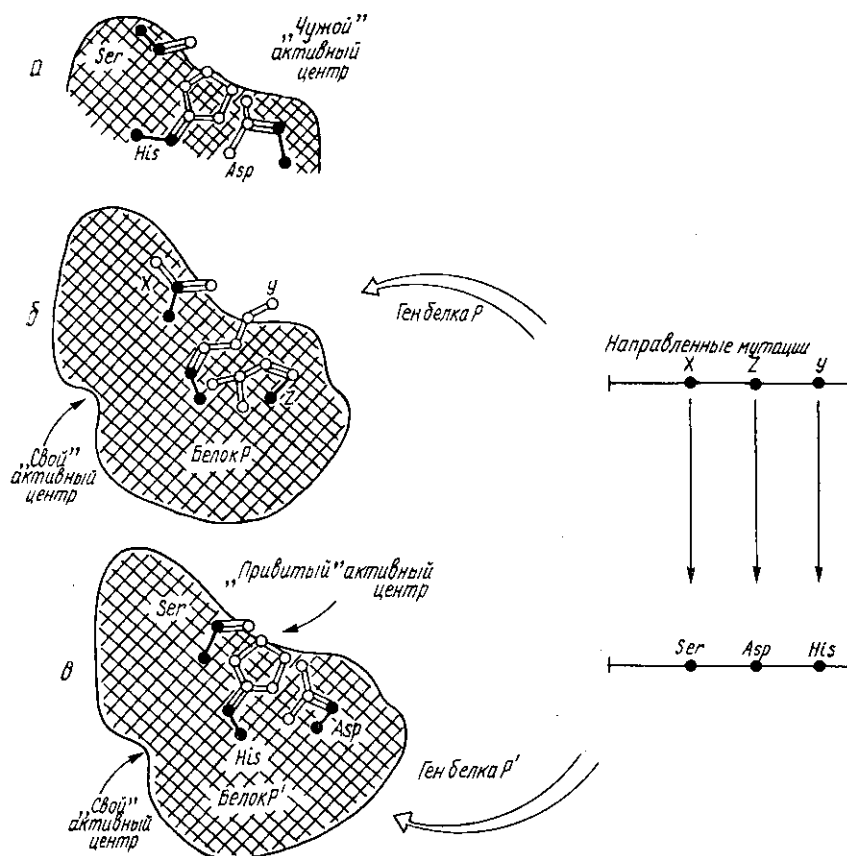


Рис. 3. Схема, иллюстрирующая идею «прививки» активного центра: *a* — расположение боковых групп в активном центре — «привое» (тройными линиями выделены связи β - и γ -атомов в боковых группах ключевых аминокислотных остатков); *б* — найденное в белке — «подвое» — сходное расположение β - и γ -атомов боковых групп; *в* — предполагаемое расположение групп в «новом» (привитом) активном центре («старый» активный центр белка может сохраниться). Справа: модификация гена при «прививке»
 Fig. 3. The «grafting» of the «alien» active site: *a* — the position of side chains in the «alien» active site; (the triple lines show the β - γ bonds in the key side chains); *б* — the similar positions of β - γ bonds in the other protein; *в* — the expected positions of the side chains of the «new» active site after the «grafting»; the «old» active site may be preserved. To the right: the scheme of the site-directed mutagenesis

размещения β - и γ -атомов) с каталитической триадой (Ser; His; Asp) сериновых протеаз. Координаты β - и γ -атомов лучшей из этих «троек» (рис. 4), найденной в лизоциме, соответствуют координатам аналогичных атомов в каталитическом центре трипсина с точностью 0,06 нм (т. е. с точностью, характерной для сходства каталитических центров разных протеаз).

Вблизи от этой «тройки» находится нечто, напоминающее субстратсвязывающую щель сериновых протеаз, прикрытую боковой цепью Leu164 — последнего остатка в цепи лизоцима. Leu164 расположен примерно там же, где в субтилизине находится боковая цепь остатка Asp155, необходимого для эффективного катализа [4] (см. рис. 2). Возможно, понадобятся еще одна — две мутации (в частности, видимо, отщепление

Leu164 или замена типа Leu164 → Asn) для придания этой щели подходящей формы. Можно полагать, что улучшить субстратсвязывающую щель (при «готовом» каталитическом центре) уже относительно проще, чем создать каталитический центр, так как щель требует существенно меньшей точности — здесь «допустимая погрешность» определяется уже не жесткостью ковалентных связей, а лишь жесткостью невалентных взаимодействий.

Анализ структурных последствий предлагаемой «прививки» показывает, что она не должна существенно сказываться на стабильности белковой глобулы. «Новый» ак-

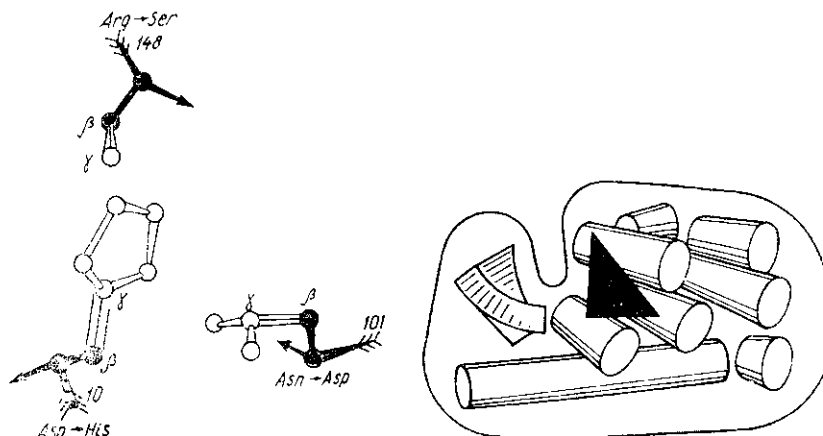


Рис. 4. Предполагаемая конфигурация боковых групп «нового» активного центра модифицированного лизоцима фага *T4*. Отмечены β - и γ -атомы, расположение которых в лизоциме сходно с расположением β - и γ -атомов в каталитическом центре сериновых протеаз

Fig. 4. The expected position of the side chains in the «grafted» active site at the phage *T4* lysozyme. The positions of the marked β - and γ -atoms coincide with the positions of corresponding atoms in the active sites of the serine proteases

Рис. 5. Расположение «привитого» (протеазного) активного центра (черный треугольник) на глобуле лизоцима фага *T4*. «Старый» активный центр размещается в щели

Fig. 5. The position of the «grafted» (protease) active site (black triangle) at the phage *T4* lysozyme globule. The «old» active site of lysozyme is situated in the cleft.

тивный центр будет находиться вне (рис. 5) «собственного» активного центра белка, так что белок с «прививкой» должен сохранить функцию лизоцима. Можно надеяться, что этот белок (вероятно, не сразу, а после некоторой «доводки») приобретет и новую функцию — функцию протеазы.

IS IT POSSIBLE TO GRAFT AN «ALIEN» ACTIVE SITE ON A PROTEIN GLOBULE?

A. V. Finkelstein

Institute of Protein Research,
Academy of Sciences of the USSR, Pushchino, Moscow Region

Summary

If a protein globule serves only as a rigid «foundation» for the active site, then the other «alien» active site can be «grafted» onto it by site-directed mutagenesis. Under this hypothesis, the mutations are singled out which should be introduced to the *T4* phage lysozyme to «graft» it the protease activity.

1. Фершт Э. Структура и механизм действия ферментов.— М.: Мир, 1980.—432 с.
2. The geometry of the reactive and of the peptide groups in trypsin, trypsinogen and its complexes with inhibitor / M. Marquart, J. Walter, J. Deisenhofer et al. // Acta cryst.—1983.—39, N 2.— P. 480—515.
3. A comparison of the three-dimensional structures of subtilisin BPN' and subtilisin Novo / J. Drenth, W. G. J. Hol, J. N. Jansonius, R. Koekoek // Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.—1981.—36.— P. 107—116.

4. Site directed mutagenesis and the role of the oxianion hole in subtilisin / P. Bryan, M. W. Pantoliano, S. G. Quill et al. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1986.—83, N 11.—P. 3743—3745
5. Птицын О. Б. Белок как отредактированный статистический сополимер // Молекуляр. биология.—1984.—18, № 3.—С. 574—590.
6. Блюменфельд Л. А. Проблемы биологической физики.—М.: Наука, 1977.—336 с.
7. Leatherbarrow R. J., Fersht A. R. Protein engineering // Protein Eng.—1986.—1, N 1.—P. 7—16.
8. Конструирование белковых молекул / А. В. Финкельштейн, М. П. Кирпичников, О. Б. Птицын, К. Г. Скрябин // Вест. АН СССР.—1988.—№ 1.—С. 102—111.
9. The protein bank. A computer-based archival file for macromolecular structures / F. C. Bernstein, T. F. Koetzle, G. J. B. Williams et al. // Eur. J. Biochem.—1977.—80, N 2.—P. 319—324.
10. Crystal structures of *E. coli* and *L. casei* dihydrofolate reductase / J. T. Bolin, D. J. Filman, D. A. Matthews et al. // J. Biol. Chem.—1982.—257, N 27.—P. 13650—13655.
11. Remington S. J., Ten Eyck L. F., Matthews B. W. Atomic coordinates for T4 phage lysozyme // Biochem. and Biophys. Res. Commun.—1977.—75, N 2.—P. 265—270.

Ин-т белка АН СССР, Пущино

Получено 29.03.88

УДК 547.963:577.213.3

ЦЕЛЕНАПРАВЛЕННЫЙ МУТАГЕНЕЗ И ЭКСПРЕССИЯ МУТАНТНОГО ГЕНА ЛИЗОЦИМА ФАГА Т4

В. В. Леонтьев, О. И. Грязнова, А. Т. Гудков

Введение. Метод олигонуклеотид-направленного мутагенеза [1] открывает широкие возможности для исследования принципов функционирования белков и в перспективе создания новых белков с заданными свойствами.

В работе [2] теоретически рассматривается возможность «прививки» активного центра сериновых протеаз на поверхность белковой глобулы. Анализ пространственной структуры ряда белков показал, что одним из подходящих «носителей» привитого активного центра может стать лизоцим бактериофага Т4 [2].

Для экспериментальной проверки такой возможности в гене этого белка нами проведены нуклеотидные замены, изменяющие смысл кодонов для трех аминокислот (Asp10→His10, Asn101→Asp101, Arg148→Ser148); сконструированы плазмиды для экспрессии мутантного белка и белка дикого типа.

Материалы и методы. В работе использованы штаммы *Escherichia coli*: JM101 ($\Delta lacpro$, *thi*, *supE*, *F'* *traD36*, *proAB*, *lacI^q*, Z Δ M15), JM105 ($\Delta lacpro$, *thi*, *strA*, *endA*, *sbcB15*, *hsdR4*, *F'* *traD36*, *proAB*, *lacI^q*, Z Δ M15), RZ1032 (*H_{ijr}KL16*, *PO/45*, *lysA* (61-62), *thi-1*, *relA1*, *SpoT1*, *dut-1*, *ung-1*, *Zbd-279*: :*Tn10*), векторный бактериофаг M13mp18. Олигонуклеотиды синтезированы на автоматическом ДНК-синтезаторе «Gene Assembler» фирмы «Pharmacia» (Швеция), ферменты рестрикции и лигирования производства НПО «Фермент» (Вильнюс). Ген лизоцима фага Т4 любезно предоставлен д-ром Тибодо (Сэтл, США).

Общая схема работы представлена на рис. 1. Ген лизоцима, исходно встроенный в бактериофаг λ 1358 [3], переклонирован в фаг M13mp18 по сайтам *XbaI* и *HindIII*. Так был получен фаг M13eI.

Кольцевую однопонитевую ДНК этого фага выделяли фенольной депротенизацией зрелых фаговых частиц [4], выращенных на штамме RZ1032. Выделенная из этого штамма фаговая ДНК содержит определенный процент замен Т→У, не приводящих к изменению кодирующих функций, но делающих ее объектом интенсивной репарации в обычных штаммах *E. coli* [4]. Кольцевую ДНК отжигали с двунитовой ДНК родительского фага M13mp18, выделенной из обычного штамма и рестрицированной по сайтам *HindIII* и *SmaI*, получая, таким образом, «дуплекс с брешью» [5]. Затем к гену лизоцима с помощью гибридизации одновременно присоединяли три мутагенных олигонуклеотида:

I (СТААГАССТТСАТСТАТАС, Asp10→His10), II (GGAAAACCATATCAATCAATGC, Asn101→Asp101), III (CGTTGTAATGACTGATTTTGC, Arg148→Ser148).