

УДК 548.737:577.152.3

*Посвящается памяти А.В. Шубникова*

## СТРУКТУРНЫЕ АСПЕКТЫ МЕХАНИЗМОВ КАТАЛИЗА И СВЯЗЫВАНИЯ ЭНДОНУКЛЕАЗАМИ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

© 2012 г. Н. Е. Жухлистова, В. В. Балаев, А. В. Ляшенко, А. А. Лашков

*Институт кристаллографии РАН, Москва, Россия*

*E-mail: alashkov83@gmail.com*

Поступила в редакцию 10.11.2011 г.

Эндонуклеазы (КФ 3.1) – ферменты класса гидролаз, катализирующие процесс гидролитического расщепления дезоксирибонуклеиновых и рибонуклеиновых кислот в любом участке полинуклеотидной цепи. Эндонуклеазы широко используются как в биотехнологических процессах, так и в ветеринарии в качестве противовирусного препарата. Перспективным является медицинское применение эндонуклеаз в терапии онкологических заболеваний человека. Проанализированы и обобщены результаты рентгеноструктурного исследования пространственной организации эндонуклеаз и их комплексов, механизм их действия. Проведенный анализ структурных исследований ферментов этого класса показал, что специфическое связывание фермента с нуклеиновой кислотой характеризуется взаимодействиями с азотистыми основаниями и с нуклеотидным остовом, а неспецифическому связыванию фермента обычно свойственны взаимодействия лишь с остовом молекулы нуклеиновой кислоты. Следует учитывать, что специфичность может модулироваться ионами металлов и некоторыми низкомолекулярными органическими соединениями. Для проверки достоверности высказываемых гипотез относительно специфических и неспецифических НК-связывающих белков необходимо проведение дополнительных исследований методами структурной биологии пространственных структур комплексов фермент-НК при атомном разрешении.

### ОГЛАВЛЕНИЕ

#### Введение

1. Применение эндонуклеаз в медицине и биотехнологии
  2. Особенности каталитической активности и пространственного строения специфических и неспецифических эндонуклеаз
    - 2.1. Специфические эндонуклеазы
    - 2.2. Активный центр специфических эндонуклеаз
    - 2.3. Неспецифические эндонуклеазы
    - 2.4. Активный центр неспецифических эндонуклеаз
    - 2.5. Механизмы регуляции каталитической активности неспецифических эндонуклеаз
  3. Структурный механизм действия специфических и неспецифических эндонуклеаз
    - 3.1. Специфические эндонуклеазы
    - 3.2. Неспецифические эндонуклеазы
  4. Механизм связывания субстрата эндонуклеазами
    - 4.1. Специфические эндонуклеазы
    - 4.2. Неспецифические эндонуклеазы
- Заключение

### ВВЕДЕНИЕ

Нуклеиновые кислоты (ДНК и РНК) играют ключевую роль в жизнедеятельности любых орга-

низмов, обеспечивая хранение и передачу генетической информации. При этом важными являются процессы метаболизма нуклеиновых кислот (НК), осуществляемого, в частности, нуклеодеполимеразами, участвующими во всех реакциях, связанных с превращением НК, начиная от расщепления при автолизе, утилизации макромолекул НК или инактивации чужеродной НК и кончая избирательным расщеплением отдельных связей в молекуле, необходимым для осуществления таких процессов, как транскрипция, репликация НК, рекомбинация, репарация, рестрикция, процессинг различных типов НК. Кроме того, нуклеодеполимеразы обладают рядом регуляторных функций [1], находят широкое распространение в биохимии в качестве инструментов генетической инженерии и являются объектом биотехнологического производства, что обусловлено возможностью их использования в качестве лечебных противовирусных и противоопухолевых препаратов и химических реагентов.

Нуклеодеполимеразы катализируют первый этап в цепочке последовательных реакций разрушения полинуклеотидной цепи, расщепляя фосфодиэфирные связи между нуклеотидами без образования свободных фосфатов и продуцируя моно- и олигонуклеотиды.

Все живые организмы содержат набор нуклеаз, которые гидролизуют фосфодиэфирные связи в НК. Используют разные схемы классификации

нуклеаз, одна из таких схем представлена в [2]. Нуклеазы могут расщеплять только рибонуклеиновые кислоты (РНК) или только дезоксирибонуклеиновые кислоты (ДНК). Существуют неспецифические нуклеазы, расщепляющие фосфодиэфирные связи как в ДНК, так и в РНК, двухцепочечные и одноцепочечные последовательности. Другим критерием классификации является тип нуклеолитической атаки. Ферменты могут отщеплять нуклеотиды от концов молекул НК (экзонуклеазы) или расщеплять внутренние фосфодиэфирные связи в ДНК или РНК (эндонуклеазы). Еще один критерий выделяет две основные группы нуклеаз: специфические, расщепляющие строго определенные последовательности ДНК или РНК; неспецифические, расщепляющие НК без предпочтения к типу основания. Нуклеазы могут расщеплять фосфодиэфирные связи между фосфором и углеродом рибозного или дезоксирибозного кольца в 3'- или 5'-положении.

Нуклеазы принадлежат классу металлозависимых ферментов; присутствие двухвалентных ионов металлов необходимо для их активности [3]. В большинстве случаев для активности нуклеаз наиболее эффективны ионы магния. Настоящая работа посвящена рассмотрению специфических и неспецифических эндонуклеаз.

#### ПРИМЕНЕНИЕ ЭНДОНУКЛЕАЗ В МЕДИЦИНЕ И БИОТЕХНОЛОГИИ

Эндонуклеазы – ферменты класса гидролаз, катализирующие процесс гидролитического расщепления ДНК или РНК в любом участке полинуклеотидной цепи. Эндонуклеазы участвуют в процессах рекомбинации, репарации, рестрикции.

Значительные достижения в области молекулярной биологии и генной инженерии во многом связаны с успешным использованием ферментов нуклеотидного обмена. К числу таких ферментов относятся эндонуклеазы рестрикции, способные узнавать специфические последовательности нуклеотидов на ДНК и разрезать ее по определенным положениям. Эндонуклеазы рестрикции часто используют при биохимическом анализе нуклеотидной последовательности и в генной инженерии для создания рекомбинантных ДНК, которые вводят затем в бактериальные, растительные или животные клетки.

Эндонуклеазу производят и применяют в молекулярно-биологических исследованиях и пчеловодстве. Препараты на основе фермента эндонуклеазы *Serratia marcescens* – наиболее подходящие средства, разрушающие вирусы и подавляющие или профилактирующие вирусные заболевания у пчел. Перспективно использование данного фермента в качестве противовирусного препарата при лечении животных [4–6].

Неспецифическая эндонуклеаза *Serratia marcescens* (*Sm*) обладает не только противовирусным, но и противоопухолевым действием, сохраняет каталитическую активность в присутствии разрушающих и дестабилизирующих компонентов, включая инкубацию в растворе 4 М мочевины и 0.1 М β-меркаптоэтанола [7, 8]. Благодаря этим качествам фермент находит широкое применение при удалении НК из биохимических и фармацевтических препаратов. Фермент является объектом биотехнологического производства под коммерческим названием “Benzonase” (Merck).

Нарушение механизмов апоптоза сопровождается множеством заболеваний, включая рак. Различные противоопухолевые терапии преследуют цель запуска апоптоза в опухолевых клетках. В [9] проведены исследования по направленному высвобождению эндонуклеаз рестрикции как потенциальных индукторов апоптоза и продемонстрировано, что направленное нуклеазоопосредованное расщепление ДНК приводит к апоптозу в клетках карциномы яичников. Были протестированы три различных типа эндонуклеаз рестрикции: случайно режущая эндонуклеаза *NucA* и ее неактивные формы и две эндонуклеазы *PvuII* и *VfiI*, режущие шесть пар оснований, включая мутантный вариант *VfiI-K107A*. *PvuII* наиболее эффективна в индукции апоптоза в клетках карциномы яичников.

Существуют два основных пути апоптоза. Рецептор-опосредованный путь, или путь “рецептора смерти” (*death*-рецептора), запускается суперсемейством “рецепторов смерти” и реагирует на разнообразные внеклеточные стимулы. Рецептор-независимый (митохондриальный путь) активируется такими внутриклеточными сигналами, как повреждение ДНК и истощение фактора роста. Противораковые лекарства, применяющиеся в клинике, используют индукцию апоптоза в клетках-мишенях по любому из путей.

Противораковые препараты, действующие через рецептор смерти, получили название **TRAIL** (*tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand*) и способны вызывать апоптоз в большинстве опухолевых клеток за счет связывания с рецепторами смерти. Так как **TRAIL** не проявляет апоптотической активности в нормальных человеческих клетках, он является привлекательным кандидатом в препараты для лечения рака. Однако некоторые типы опухолей, включая некоторые карциномы яичников, резистентны к **TRAIL**.

Данные, представленные в [9], четко показывают эффективность высвобождения рестрицирующих эндонуклеаз с использованием смеси **SAINT-18** (1-метил-4-(*цис*-9-лиолеил)-метилпириниум-хлорид) и **DOPE** (диолеил-фосфатидилэтанолламин), что приводит к апоптозу. Апоптотическая активность, однако, наблюдается в некоторых пределах и в нормальных клетках, требуя

направленного (на мишень) высвобождения эндонуклеаз при применении *in vivo*. Сочетание с антителами или SD и другими липосомальными композициями раскрывает новые стратегии направленного воздействия на раковые клетки или очаги хронического воспаления. Так как эти стратегии должны оптимизироваться, предполагается, что направленное высвобождение эндонуклеаз рестрикции станет многообещающим методом индукции гибели клеток-мишеней, например, резистентных опухолей.

## 2. ОСОБЕННОСТИ КАТАЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ И ПРОСТРАНСТВЕННОГО СТРОЕНИЯ СПЕЦИФИЧЕСКИХ И НЕСПЕЦИФИЧЕСКИХ ЭНДУКЛЕАЗ

Детальное понимание функционирования ферментов требует их разностороннего изучения различными методами, в том числе рентгеноструктурных исследований. Исследование первичной, вторичной, третичной и четвертичной структур ферментов имеет цель прежде всего лучше понять олигомерное и пространственное строение фермента, понять как упакованы отдельные регулярные участки (спирали, разупорядоченные спирали,  $\beta$ -ленты), какова роль аминокислотных последовательностей в реализации химического механизма действия ферментативной молекулы. Выполнение этих задач в свою очередь требует идентификации каталитически важных остатков активного центра, анализа их реактивного состояния и динамики взаимодействия, знания их взаимной топографической ориентации в отдельном фрагменте белковой молекулы и знания трехмерной структуры в целом.

### 2.1. Специфические эндонуклеазы

Среди специфических эндонуклеаз наиболее изученными являются эндонуклеазы рестрикции (ЭР), способные узнавать и разрезать определенные последовательности в ДНК. Эндонуклеазы рестрикции функционируют во всех прокариотах, археях и отдельных одноклеточных водорослях как компоненты защитных систем рестрикции-модификации (Р-М) [10–12]. При этом название ферментов “эндонуклеаза рестрикции” (рестрикция, т.е. ограничение) указывает на то, что данный процесс ограничен чужеродной молекулой, в то время как ДНК клетки-хозяина не расщепляются благодаря наличию специфических защитных механизмов.

Для обозначения систем Р-М принято использовать номенклатуру, предложенную в 1973 г. Смитом и Натансом [13], которая использовалась в течение продолжительного времени. Однако, по мере того, как все больше и больше систем Р-М было обнаружено и охарактеризовано, возникла

необходимость дополнения или изменения принятой номенклатуры. Следовало принять во внимание появление в каждом типе эндонуклеаз дополнительного деления на подтипы (особенно это было актуально для ЭР II-го типа, которых к 2003 г. уже было известно более 3500). Эндонуклеазы геной конверсии (хoming эндонуклеазы), например I-SceI [14, 15], I-PpoI [16], I-TevI [17], также стали называть, следуя правилам принятой в 1973 г. системы обозначений. В 2003 г. в [11] была предложена доработанная номенклатура для обозначения ЭР, эндонуклеаз геной конверсии и их генов. На основании строения субъединиц, требований, предъявляемым кофакторам, специфике узнавания ДНК, механизма их действия ЭР подразделяют на четыре типа [11].

Большинство известных до сих пор сайт-специфических эндонуклеаз микроорганизмов (эндонуклеаз рестрикции), входящих в состав систем Р-М, дополняются в бактериальной клетке НК-метилтрансферазой той же специфичности. Предполагается, что ЭР защищают клетку от проникновения чужеродной (например, фаговой) НК, а метилазы, модифицируя тот же сайт узнавания, защищают хозяйскую НК от расщепления собственной рестриктазой. Однако обнаруженные в дальнейшем сайт-специфические эндонуклеазы, гидролизующие только метилированную НК [18, 19], не входят в состав Р-М систем, хотя в предложенной классификации они отнесены к ЭР II-го типа к подгруппе ПМ, т.е. узнающим только метилированную ДНК [11].

В литературе имеется достаточно информации о пространственной архитектуре и механизме действия эндонуклеаз, особенно ЭР, среди которых наиболее известными к настоящему времени являются ЭР типа II [20]. Благодаря высокой специфичности ЭР типа II служат великолепными моделями для изучения НК-белковых взаимодействий и эволюционных взаимосвязей среди разных групп белков. Эндонуклеазы рестрикции типа II узнают в НК специфические последовательности нуклеотидов и осуществляют гидролиз фосфодиэфирных связей внутри или рядом с узнаваемой последовательностью, при этом образуются фрагменты ДНК с концевыми 5'-фосфатными и 3'-ОН-группами [11]. Обычно для функционирования ЭР необходимы ионы  $Mg^{2+}$ . Было охарактеризовано несколько подтипов ЭР типа II [21–26].

Большинство ЭР типа II имеет общий мотив последовательности PD...(D/E)XK [27]. Сравнительный анализ аминокислотных последовательностей различных по функциональным особенностям белков выявил наличие такого мотива (PD...(D/E)XK) и в белках, относящихся к другим классам. Тот факт, что разные НК-связывающие белки имеют общий структурный мотив, дает ос-

нование предполагать существование общего, хотя и далекого предка.

Существует информация о кристаллических структурах приблизительно 30-ти ЭР II типа из суперсемейства PD...(D/E)XK, которые расщепляют дуплекс НК (в присутствии  $Mg^{2+}$ ) в пределах или рядом с соответствующим ему узнаваемым участком последовательности (4–8 пар оснований). Среди них – BamHI, BcnI, BglI, BglII, BpuJI, Bse634I, BsoBI, BstYI, Cfr10I, Ecl18kI, EcoO109I, EcoRI, EcoRII, EcoRV, FokI, HinPII, HincII, HindIII, MspI, MunI, MvaI, NaeI, NgoMIV, NotI, PspGI, PvuII, SdaI, SfiI, и SgrAI. Несмотря на несхожесть первичных последовательностей и пространственных структур, эти эндонуклеазы, как показано в [10], содержат “ядро”, включающее патиенточный смешанный  $\beta$ -лист, фланкированный  $\alpha$ -спиралями, а 2-я и 3-я  $\beta$ -ленты формируют полость для каталитических остатков PD...(D/E)XK.

Суперсемейство может быть разделено на EcoRI (или  $\alpha$ ) и EcoRV (или  $\beta$ ) подсемейства, в зависимости от того, параллельна или антипараллельна пятая  $\beta$ -лента первой  $\beta$ -ленте. Вторая и третья  $\beta$ -ленты включают в себя каталитические остатки мотива PD...(D/E)XK, который не абсолютно консервативен: лизин заменяется глутаминовой кислотой в BamHI и глутамином в BglII, BstYI, HinPII и NotI. Кроме того, в Bse634I, Cfr10I, EcoO109I, EcoRII, Ecl18kI, NgoMIV и PspGI второй карбоксилат мотива PD...(D/E)XK принадлежит соседней  $\alpha$ -спирали, что свидетельствует скорее о важности пространственных совпадений остатков, чем о необходимости совпадений при выравнивании первичных последовательностей. Наконец, в SdaI два аминокислотных остатка отделяют E и K в мотиве PD...(D/E)XK. В [28] рассмотрены представители эндонуклеаз семейства EcoRI, часть из них – комплексы фермент–ДНК, некоторые с двухвалентными ионами металлов (одним или двумя)  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ .

Примером специфических эндонуклеаз типа II является HindIII из *Haemophilus influenzae* Rd, которая взаимодействует с ДНК на участке палиндромной последовательности A/AGCTT. В [29] изложены результаты белково-инженерного исследования эндонуклеазы HindIII, а в [30] описаны трехмерные кристаллические структуры HindIII с узнаваемой ею ДНК с и без двухвалентных катионов, решенные при разрешении 2.17 и 2.00 Å, соответственно. Эндонуклеаза HindIII принадлежит подсемейству EcoRI-подобных ( $\alpha$ -класс) эндонуклеаз. В структуре с  $Mg^{2+}$  выявлено наличие в каждом активном центре по два иона. Авторы [30] считают, что на основании знаний о структурах комплексов HindIII с узнаваемой ею ДНК можно внести ясность в механизм специфического узнавания этой эндонуклеазой субстрата,

согласно которому она узнает палиндромную последовательность A/AGCTT.

Среди подтипов ЭР типа II эндонуклеазы рестрикции ПЕ имеют уникальное свойство – для эффективного расщепления ДНК они должны одновременно связать две копии их палиндромных участков узнавания в ДНК, при этом одна копия служит мишенью для расщепления, а другая является аллостерическим эффектором [11]. Эндонуклеазы рестрикции типа ПЕ – это привлекательные модели для изучения специфических ДНК-белковых взаимодействий в сложных генетических процессах, в которых ферменты взаимодействуют одновременно с несколькими участками ДНК. Гомодимерный белок EcoRII – пример ферментов типа ПЕ [31]. EcoRII расщепляет в ДНК последовательность  $\downarrow$ ССА/TGG в обеих цепях (место расщепления указано стрелкой). Изучение расщепления EcoRII двух отдельных участков узнавания на одной молекуле ДНК показало, что кооперативность между EcoRII-участками достигается образованием изгиба или петли ДНК между этими участками (*cis*-взаимодействия) [32]. С помощью трансмиссионной электронной микроскопии удалось показать, что EcoRII служит связующим звеном в образовании этой петли [33].

Эндонуклеаза SfiI [34] подобно другим членам семейства типа ПF разрывает связи, связав две копии распознанной ею последовательности, при этом согласованно расщепляет все четыре цепи ДНК. Встраивание в SfiI неузнаваемой ДНК приводит к образованию неактивного комплекса, который не может контактировать с другими сайтами ДНК [35].

Решены кристаллические структуры комплексов эндонуклеазы SfiI с ДНК [34]. Структуры выявили два разных состояния связывания ДНК эндонуклеазой: одно – с полностью занятыми сайтами связывания ДНК, другое – с полностью и частично занятым сайтом. Эти два состояния выявляют, по мнению авторов, детали того, как SfiI распознает и расщепляет ДНК в нужном сайте, и проливают свет на детали связывания фермента и ДНК. Последовательность, узнаваемая SfiI (GGCCNNNNkNGGCC), является подмножеством последовательности, узнаваемой BglI (GCCNNNNkNGGC). В [34] показано, что, хотя SfiI является тетрамером, а BglI димером, и существует лишь небольшое подобие первичных последовательностей в этих ферментах, модели механизма распознавания ДНК одинаковы.

Особым классом сайт-специфических эндонуклеаз являются хоминг-эндонуклеазы. Первоначально открытые рамки считывания хоминг-эндонуклеаз были обнаружены в митохондриальных геномах дрожжей в составе мобильных интронов группы I, которые способ-

ны перемещаться в безинтронный аллель (явление получило название хоминг от английского *homing* — возвращение домой). Как оказалось, мобильность интронов группы I обусловлена кодируемыми ими сайт-специфическими эндонуклеазами, которые способны дифференцированно узнавать безинтронный аллель и вносить в него разрыв. Репарация поврежденной молекулы осуществляется по интактной ДНК интрон-содержащего аллеля, что приводит к генной конверсии — замещению безинтронного аллеля интрон-содержащим.

Хоминг-эндонуклеазы отличаются от ЭР II типа по нескольким аспектам. В то время как нуклеазы рестрикции II типа связывают короткие, обычно симметричные узнаваемые последовательности из 4–8 пар оснований, хоминг-эндонуклеазы связывают очень длинные асимметричные последовательности из 12–40 пар оснований. Хоминг-эндонуклеазы более толерантны к деградации в узнаваемой последовательности. Небольшие изменения в распознаваемой последовательности уменьшают активность хоминг-эндонуклеаз, но не уничтожают ее.

Хоминг-эндонуклеазы действуют как мономеры или гомодимеры и часто требуются сопутствующие белки для регуляции их активности. Ферменты рестрикции типа II также могут функционировать в одиночку как мономеры или гомодимеры или с дополнительными белковыми субъединицами, но эти субъединицы отличаются от тех, что существуют для хоминг-эндонуклеаз. Хотя рестрикционные ферменты и хоминг-эндонуклеазы выполняют функцию расщепления двухцепочечных ДНК, развивались они независимо.

Интерес к хоминг-эндонуклеазам обусловлен их структурно-функциональными особенностями. Так как хоминг-эндонуклеазы способны узнавать протяженные вырожденные последовательности, то образуется большое число специфических и неспецифических контактов с ДНК по всей длине сайта узнавания. Как следствие, практически каждая хоминг-эндонуклеаза узнает уникальную последовательность ДНК. Структурные и биохимические исследования этих ферментов не только расширяют границы представлений о природе ДНК-белковых взаимодействий, но и служат основой для создания эндонуклеаз с заданной специфичностью. Не менее интересны хоминг-эндонуклеазы с точки зрения познания эволюционных механизмов. Как правило, эти ферменты с высокой эффективностью инициируют генетический обмен между близкородственными видами и таким образом участвуют в горизонтальном переносе генетической информации.

Хоминг-эндонуклеазы по структурным мотивам разделяют на семейства. Известны шесть семейств хоминг-эндонуклеаз, классифицируемых по консервативным структурным мотивам.

В хоминг-эндонуклеазах с LAGLIDADG-мотивом эта последовательность непосредственно вовлечена в процесс расщепления ДНК. Мотив LAGLIDADG включает в себя остатки как из интерфейса между белковыми доменами или субъединицами, так и из активных центров фермента. Ферменты, имеющие только один мотив LAGLIDADG, работают как гомодимеры, имеющие два мотива — как мономеры. Представителями этого семейства хоминг-эндонуклеаз, для которых исследованы кристаллические структуры, являются PI-SceI и I-CreI [36, 37].

Ферментом из семейства с консервативным мотивом GIY-YIG является I-TevI, который действует как мономер. Исследованы структуры этой нуклеазы в комплексе с ДНК и без нее [38, 39].

Эндонуклеазы, содержащие NHN-мотив, имеют схожие последовательности приблизительно из 30-ти аминокислот, которые включают в себя две пары консервативных аминокислотных остатков гистидина и один аспарагин, и образуют цинковый домен. Наилучшим образом охарактеризована эндонуклеаза I-HmuI, действующая как мономер [40].

Представителем семейства хоминг-эндонуклеаз, включающих в себя каталитический домен с PD...(D/E)XK-мотивом, обычно существующим в ЭР II типа, является I-Ssp6803I [41].

В Vsr-like хоминг-эндонуклеазах термин “Vsr-like” напоминает о присутствии C-концевого домена в нуклеазе, который имеет явную гомологию с бактериальными (*Very Short Patch Repair* (Vsr)) эндонуклеазами [42].

Ферменты, имеющие область из 30-ти аминокислот, включающих пять консервативных остатков: два гистидина и три цистеина, носят название His-Cys-box. Первой исследованной эндонуклеазой из семейства His-Cys-box была хоминг-эндонуклеаза I-PpoI из *Physarum polycephalum*.

Высокоспецифическая интронкодируемая металлзависимая хоминг-эндонуклеаза I-PpoI из *Physarum polycephalum* [43] принадлежит семейству нуклеаз, которые в процессе выполнения своей биологической функции производят сайт-специфический двухнитевой разрез ДНК, оставляя фосфат на 5'-конце. Нуклеаза I-PpoI узнает лишь асимметричную последовательность 15–40 пар оснований соответствующего интронобразующего центра двухспиральной ДНК [44, 45]. *In vivo* интронкодируемая нуклеаза I-PpoI инициирует сайт-специфический перенос мобильной группы гена от одной интронсодержащей аллели хромосомы к другой и принадлежит, как уже упоминалось, к группе так называемых Cys-His-кластеробразующих цинксвязывающих белков [46]. Результаты исследования структуры кристаллических комплексов нуклеазы I-PpoI с ДНК и продуктами ее деградации опубликованы в [43]. Нук-

леза I-*PpoI* состоит из 163-х аминокислотных остатков и представляет собой гомодимерную молекулу размером  $25 \times 35 \times 80 \text{ \AA}$  со смешанной  $\alpha/\beta$  структурной топологией. Каждый из мономеров белка формируется тремя антипараллельными  $\beta$ -лентами, фланкированными двумя  $\alpha$ -спиралями, и протяженной С-концевой петлей и стабилизируется двумя  $\text{Zn}^{2+}$ -содержащими кластерами [43] (рис. 1).

## 2.2. Активный центр специфических эндонуклеаз

Решение кристаллических структур комплексов ЭР *EcoRI* и *EcoRV* дало основание полагать, что активные центры обеих нуклеаз подобны и характеризуются мотивом PD...(D/E)XK [47]. Важность этих консервативных остатков исследовалась с помощью направленного мутагенеза. Было установлено, что аминокислотные остатки кислоты необходимы для расщепления нуклеотидной последовательности, так как в каждом случае замена остатка на аланин приводит к полной инактивации фермента. Остаток лизина также непосредственно участвует в катализе; замена его на аланин снижает активность на 3 порядка. Остаток пролина, как показано для *EcoRI*, оказался не важным для катализа.

В дальнейшем было установлено, что активные центры ЭР типа II схожи между собой и содержат по крайней мере три аминокислотные остатка, которые консервативны. Для большинства известных структур ферментов типа II, принадлежащих суперсемейству PD...(D/E)XK-нуклеаз, за активный центр было принято считать (P)D-Xn-(D/E)-X-K (подчеркнуты остатки, вовлекаемые в процесс катализа). Однако с каждой новой структурой это правило подвергалось сомнению, так что несомненным осталось лишь то, что первым каталитическим остатком, координирующим каталитически важный металл, является аспарат. Второй каталитический остаток обычно кислотный. Исключением являются эндонуклеазы *MspI* [48] и *HinP1I* [49], которые имеют аспарагин и глутамин соответственно во второй позиции. Хотя третий каталитический остаток обычно лизин, но он заменен глутаматом в *VamHI* [50, 51] или глутамином в *BstYI* [52]. Типичным почти для всех нуклеаз рестрикции является то, что второй и третий каталитические остатки разделены гидрофобным остатком.

Рентгеноструктурные исследования показали, что ЭР имеют два сайта связывания ионов металла. Функции этих двух ионов, по-видимому, различны [28].

На рис. 2 в одной и той же ориентации представлены активные центры комплексов ЭР: *VamHI* и *BglII* – комплексы фермент-субстрат,



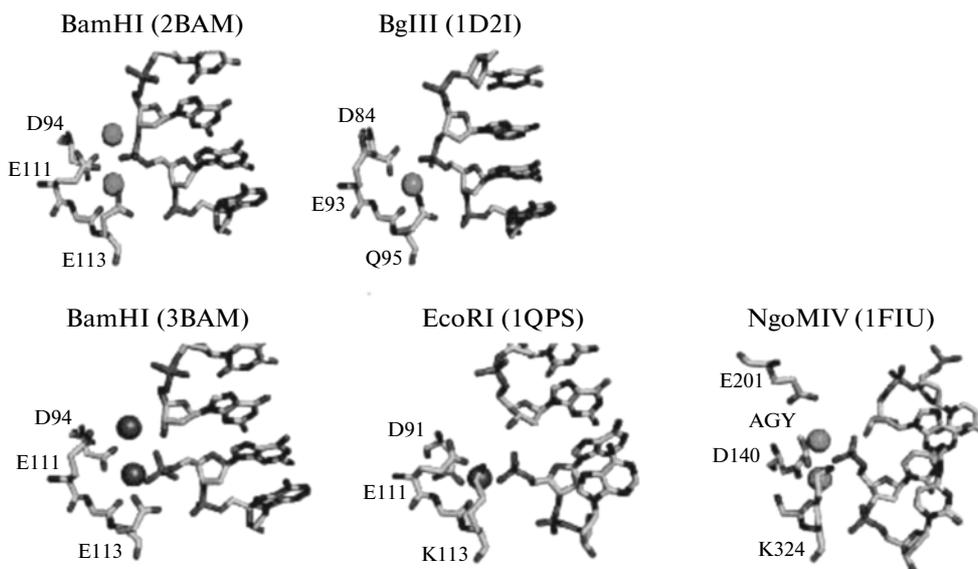
Рис. 1. Пространственная структура комплекса димера нуклеазы I-*PpoI* с фрагментом двухнитевой ДНК в качестве субстрата; сферами изображены ионы цинка (ID PDB: 1A74).

*VamHI*, *EcoRI* и *NgoMIV* – комплексы фермент-продукт.

Рентгеноструктурные исследования комплексов эндонуклеаз *SfiI* и *BglII* с ДНК выявили, что в активных центрах этих ферментов локализованы соответственно один и два иона металла. На рис. 3 [34] представлены каталитические остатки эндонуклеаз *SfiI* (Asp79, Asp100, Lys102) и *BglII* (Asp116, Asp142, Lys144) активного центра в комплексах этих ферментов с ДНК. В структуре *BglII* два иона металла в активном центре [53] соответствуют позициям ионов металла в комплексах *VamHI* [54] и *NgoMIV* [55] с ДНК, для которых был предложен двухметаллический механизм расщепления ДНК, подтвержденный исследованиями в растворах.

В эндонуклеазе *SfiI* положение иона металла, координированного Asp79 и Asp100, соответствует одной из позиций в *BglII*. Ион металла, занимающий вторую позицию в *BglII*, координирован Thy1 (O3'), Ade2 (O2P), Asp116 (OD1) и четырьмя молекулами воды [53]. Тот факт, что расстояния между ДНК и остатками активного центра в *SfiI* больше, авторы [34] объясняют отсутствием второго иона металла в активном центре этого комплекса, что, по их мнению, является результатом более низкого pH (4.6–5.0), при котором получены кристаллы, по сравнению с тем, что был использован для комплекса *BglII*/DNA (pH 6.5).

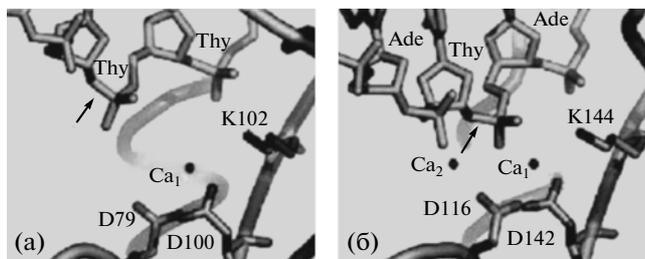
В результате рентгеноструктурного исследования [30] кристаллических структур *HindIII* в комплексах с ДНК в отсутствие ионов металла и с металлами было выявлено, что в активном центре комплекса эндонуклеазы *HindIII*, настоящей в растворе с ионами  $\text{Mg}^{2+}$ , существуют две позиции металла ( $\text{Mg}^{2+}$  и  $\text{Mn}^{2+}$ ) и расщепленные цепи ДНК (рис. 4). Расстояние между двумя ионами  $3.98 \text{ \AA}$ , что соответствует модели переходного состояния в двухионном механизме действия [54].



**Рис. 2.** Активные центры комплексов эндонуклеаз рестрикции, представленные в одной ориентации (BamHI и BglII – комплексы фермент–субстрат, BamHI, EcoRI и NgoMIV – комплексы фермент–продукт). Показаны аминокислотные остатки мотива PD...D/EХК и остатки ДНК около атакуемых фосфатных связей. Ионы металла показаны сферами [28].

Ион  $Mn^{2+}$  (рис. 5а) координирован пятью атомами, а ион  $Mg^{2+}$  – шестью (рис. 5б). Авторы [30] отмечают конформационные изменения важного для активности HindIII остатка Asp108, изменение конформации которого приводит к тому, что он участвует в координации сразу двух ионов металла, взаимодействуя непосредственно с  $Mn^{2+}$ , а через молекулу воды – с  $Mg^{2+}$ .

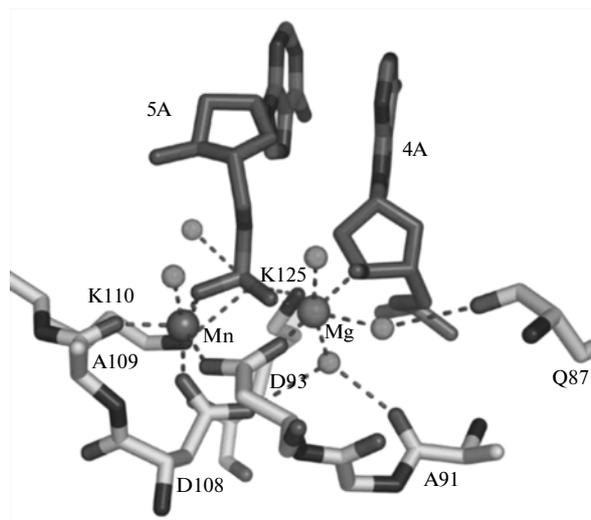
Авторы [47] считают, что мотив PD...(D/E)ХК не является достаточным для определения активных центров рестриктаз, потому что эндонуклеаза CfrIОI содержит PD...(D/E)ХК – мотив, который не является частью активного центра, а EcoRI содержит два таких мотива, один из которых не участвует в катализе. Наличие остатка пролина является необязательным в EcoRI, и он отсутствует в RvuII и BamHI. Структуры CFI-101 и BamHI демонстрируют, что вторая часть мотива также переменна.



**Рис. 3.** Активные центры SfiI (а) и BglII (б). Расщепляемая фосфодиэфирная связь указана стрелкой. Молекулы воды не показаны [34].

### 2.3. Неспецифические эндонуклеазы

Эндонуклеаза *Sm*. Среди членов семьи ДНК/РНК неспецифических нуклеаз внеклеточная эндонуклеаза *Sm* – это одна из наиболее изученных бактериальных нуклеаз, проявляющих широкую субстратную специфичность. Начальные исследования нуклеазы *Sm* инициировались выделением гомогенных препаратов фермента из природных штаммов бактерий [8, 56]. Далее были достигнуты успехи в экспрессии, секреции и получении рекомбинантных форм нуклеаз [57, 58],



**Рис. 4.** Активный центр эндонуклеазы HindIII в комплексе с ДНК [30].

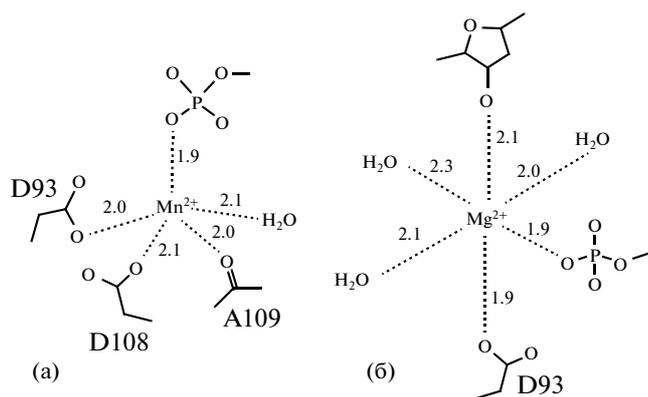


Рис. 5. Схематическое представление координации ионов  $Mn^{2+}$  (а) и  $Mg^{2+}$  (б) в структуре кристаллического комплекса HindIII с ДНК [30].

открывшие широкие возможности сайтспецифического мутагенеза и синтеза мутантных аналогов белка с прогнозируемыми на базе структурно-функционального анализа свойствами. Известны многие физико-химические и биохимические свойства каталитически значимых аминокислотных остатков, предложены модели механизма действия данного фермента [8, 59–65]. Эндонуклеаза *S. marcescens* представляет собой ряд эволюционно родственных и широко распространенных в мире про- и эукариот нуклеаз, различающихся физиологической ролью [36, 66–68]. Среди членов семейства ДНК/РНК неспецифических нуклеаз внеклеточная нуклеаза *Sm* является ферментом с известной кристаллической структурой [62, 69–71]. Активный центр этой нуклеазы был идентифицирован и охарактеризован методом сайт-направленного мутагенеза [58–61, 72].

Металлозависимый фермент, эндонуклеаза *Sm*, функционирует только в присутствии двухвалентных катионов. Фермент проявляет оптимальную активность при pH 6.5–8.0 в присутствии 5–10 мМ  $Mg^{2+}$ , при этом ионы других металлов ( $Mn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,

$Ni^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ) могут замещать  $Mg^{2+}$ . Ионы  $Ca^{2+}$  ингибируют нуклеазу *Sm*.

Эндонуклеаза *Sm* [58, 69, 73] представляет собой димер, состоящий из двух одинаковых по первичной последовательности субъединиц с 245-ю аминокислотными остатками в каждой. Молекулярный димер структуры эндонуклеазы *Sm* имеет некристаллографическую ось симметрии 2-го порядка. Третичная структура фермента может быть описана тремя основными областями вторичной структуры: центральным  $\beta$ -слоем, состоящим из шести антипараллельных  $\beta$ -лент,  $\alpha$ -доменом, образованным четырьмя короткими  $\alpha$ -спиралями (они расположены между N- и C-концевыми участками молекулы) и  $\alpha/\beta$ -конформационным доменом, формирующим верхний слой глобулы, который содержит двойной  $\beta$ -лист, обрамленный симметричной системой из восьми спиральных фрагментов (рис. 6).

Неспецифическая эндонуклеаза *Ivn* из *Vibrio vulnificus* [74] принадлежит семейству периплазматических или внеклеточных нуклеаз, которые вовлекаются в процесс защиты бактериальных клеток. Эти нуклеазы содержат сигнальный пептид, локализованный на N-конце, и восемь консервативных остатков цистеина. Сигнальный пептид отщепляется в процессе транспорта энзима из цитоплазмы в периплазму. Все эти эндонуклеазы способны взаимодействовать с ДНК и РНК и активны только в окисленной форме.

Кристаллические структуры *Ivn* и мутанта *Ivn* в комплексе с 8-ю парами оснований ДНК были решены с разрешением 2.3 Å. Пространственное строение этой эндонуклеазы отличается от строения других эндонуклеаз и имеет смешанную  $\alpha/\beta$ -топологию. Тем не менее при сравнении с другими нуклеазами выявляется схожее строение активного центра эндонуклеазы *Ivn*, который включает в себя две антипараллельные  $\beta$ -ленты и одну  $\alpha$ -спираль с локализованным между ними двухвалентным ионом металла, так называемый  $\beta\beta\alpha$ -металл-мотив. Структура *Ivn*, не имея в целом никакого сходства с другими неспецифиче-

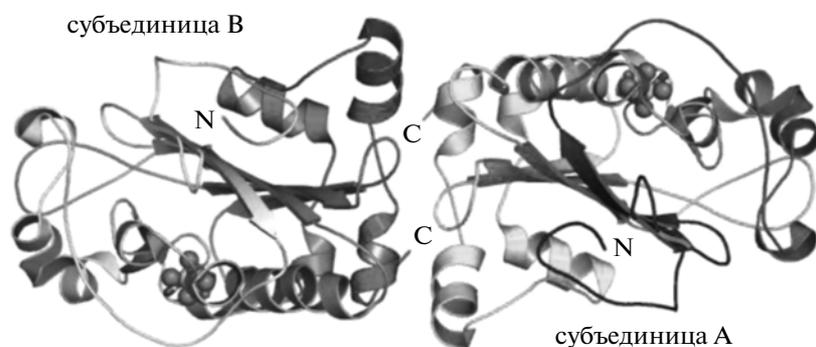


Рис. 6. Молекула эндонуклеазы *Sm*. Сферами показаны ионы  $Mg^{2+}$  и вода в активных центрах (PDB: 1G8T).

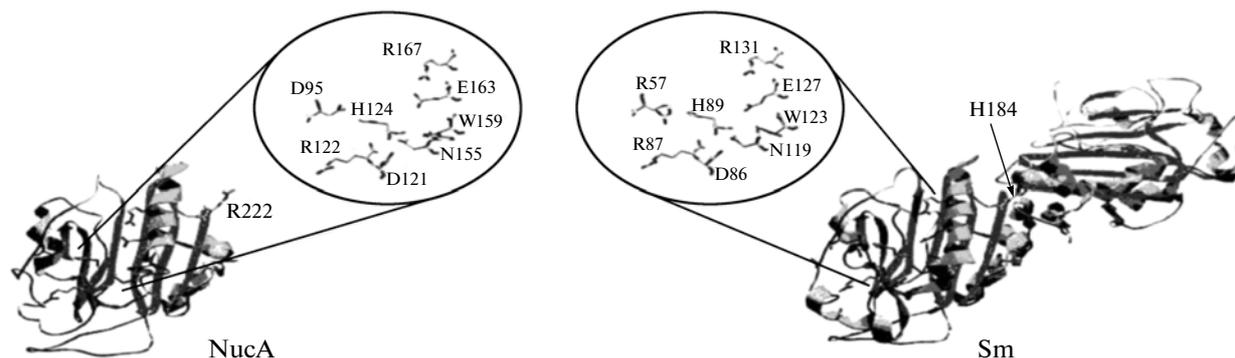


Рис. 7. Неспецифические *Anabaena* (мономер) и *Serratia* (димер) эндонуклеазы; в окружностях показаны важные аминокислотные остатки из активных центров NucA и *Serratia* нуклеаз [80].

скими эндонуклеазами, однако имеет характерный  $\beta\beta\alpha$ -металл-мотив активного центра, выявленный, например, у эндонуклеазы *Sm* и хоминг-эндонуклеазы *I-PpoI*. Суперпозиция областей вторичных структур  $\beta\beta\alpha$ -мотива, рассчитанная по  $C\alpha$ -атомам между *Sm* и *Vnp* эндонуклеазами, согласно [75], показала хорошее соответствие областей активного центра (r.m.s.d. = 0.58 Å) для этих ферментов. Совмещение показало также консервативность остатка гистидина (His80 в *Vnp*, His98 в *I-PpoI*, His89 в *Sm*). Ион  $Mg^{2+}$  в *Vnp* связан с Glu79, Asn127 и четырьмя молекулами воды.

Решены кристаллические структуры периплазмических/внеклеточных эндонуклеаз из *Vibrio salmonicida* (*VsEndA*) и *Vibrio cholerae* (*VcEndA*), гомология первичных последовательностей между которыми составляет 71 %, а с *Vnp* – 73%. Пространственное строение этих трех эндонуклеаз практически идентичное: при суперпозиции *VsEndA* с *VcEndA* и *Vnp* по атомам основной цепи r.m.s.d. равны 0.87 и 0.91 Å соответственно. Различия наблюдаются в основном в областях молекул, контактирующих при укладке в кристаллическую ячейку. Разницу в распределении аминокислотных остатков на поверхности фермента и количестве солевых мостиков авторы [76] связывают с различиями в действии ферментов.

Неспецифическая эндонуклеаза NucA из *Anabaena sp.* PCC 7120 [68] является очень активным ферментом, который в присутствии  $Mn^{2+}$  или  $Mg^{2+}$  может с почти равной каталитической эффективностью расщеплять одно- и двухцепочечные как ДНК, так и РНК. Как и многие другие неспецифические нуклеазы, NucA обнаруживает определенное предпочтение последовательности нуклеотидов. Предполагается, что локальные структурные особенности субстрата влияют на скорость расщепления фосфодиэфирных связей. На двухцепочечной ДНК определенной последовательности NucA предпочитает расщеплять фосфодиэфирные связи в участках  $d(C) \cdot d(G)$  и в тех

последовательностях, у которых есть склонность принять А-подобную конформацию [44, 57, 77].

Прокариотические нуклеазы из семейства ДНК/РНК-неспецифических нуклеаз, например нуклеазы *Sm* и NucA, выделяются во внеклеточную среду и, вероятно, служат целям обеспечения бактериальной клетки нуклеотидами на пути утилизации отходов метаболизма и/или фосфатами, когда их недостаточно в окружающей среде [78]. Гомология последовательностей NucA и эндонуклеазы *Sm* 29.5%. Эта гомология главным образом распространяется на активный центр и центральный шестистрендовый  $\beta$ -лист фермента (рис. 7). Четвертичные структуры обеих нуклеаз различаются: NucA – мономер [77], в то время как нуклеаза *Sm* – гомодимер [62, 71, 79].

Исследования, основанные на гомологичном моделировании и подтвержденные результатами CD-спектроскопии, позволили авторам [80] представить структурную модель NucA, которая объясняет, по их мнению, почему эта нуклеаза – мономерный фермент в отличие от димерной нуклеазы *Sm*.

Авторы [80], используя структурную модель NucA, пытаются решить три вопроса: почему NucA в отличие от эндонуклеазы *Sm* мономер; каков механизм действия NucA; каков механизм ингибирования NucA посредством NuiA. Структурная модель, полученная на основании соответствия последовательностей NucA и эндонуклеазы *Sm*, а также кристаллическая структура эндонуклеазы *Sm* [71] дают прямое объяснение, почему NucA – мономерный белок, в то время как нуклеаза эндонуклеазы *Sm* – гомодимер [62] (рис. 7). Интерфейс между мономерами димерной эндонуклеазы *Sm* сформирован двумя связанными некристаллографической симметрией  $\alpha$ -спиралями [81] (рис. 8), которые отсутствуют в структурной модели NucA. Более того, взаимодействие субъединица/субъединица в нуклеазе *Sm* формируется остатком гистидина His184, замена которого на аргинин приводит к мономеризации [79]; в струк-

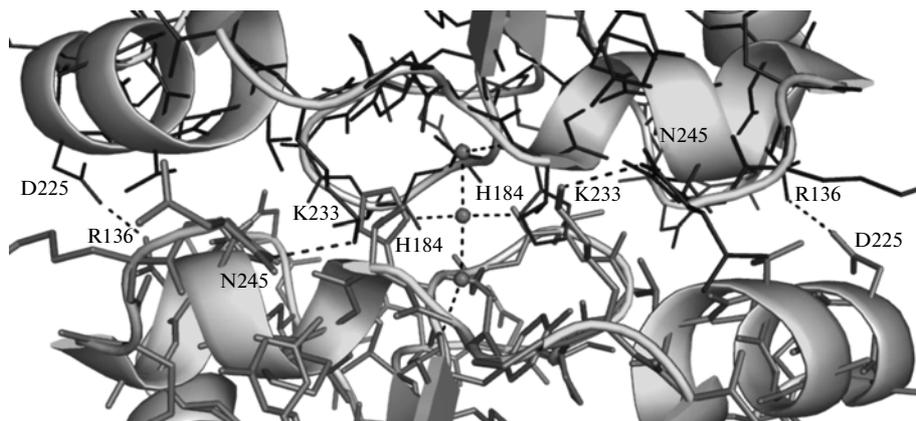


Рис. 8. Фрагмент межмолекулярных контактов между субъединицами димера в эндонуклеазе *Sm*. Молекулы воды показаны кружками; водородные и солевые связи — пунктирными линиями (ID PDB: 1G8T).

турной модели нуклеазы *Anabaena sp.* аналогичный остаток — аргинин (Arg222).

Остатки гистидина 184 в межмономерной области нуклеазы *Sm* находятся в положениях, обеспечивающих посредством молекул воды связь между мономерами. Кроме того, солевой мостик, формирующий контакт между двумя субъединицами в эндонуклеазах *Sm* (Asp225/A—Arg136/B), отсутствует в *NucA*, где в аналогичных позициях находятся остатки Asn и Gln. Также в *NucA* нет межсубъединичного солевого мостика Lys233/A—Glu239/B, имеющегося в эндонуклеазе *Sm*.

Несмотря на схожесть структур мономеров эндонуклеаз *Sm* и *NucA*, имеется ряд заметных различий, что не удивительно из-за небольшой гомологии первичных последовательностей этих нуклеаз. Например, при совмещении (выравнивании) первичных последовательностей *NucA* и *Sm* нуклеаз [82] установлено, что в *NucA* Arg57, который, как считают, в эндонуклеазе *Sm* играет важную роль для стабилизации переходного состояния. Авторами [82] первоначально было сделано предположение, что в *NucA* или существует иной механизм для стабилизации переходного состояния, или существует структурное соответствие, которое не согласуется с соответствием первичных последовательностей. Анализ пространственных структур привел к выводу, что остаток Arg93 в *NucA* структурно соответствует Arg57 в эндонуклеазе *Sm* и, возможно, участвует в катализе, стабилизируя переходное состояние.

Нуклеаза *EndoG* перемещается в ядро клетки во время апоптоза, чтобы участвовать в деградации ДНК [83]. Фермент разрывает двойные и одинарные цепочки ДНК и РНК. Родственные нуклеазы обнаружены и в эукариотах, и прокариотах. Они вовлечены в сложные процессы защиты генома от саморазрушающей нуклеазной активности. Действие *EndoG* подавляется заключением ее в митохондриальное межмембранное

пространство, а локализованный в ядре белковый ингибитор защищает клеточные полинуклеотиды от деградации при неапоптозных условиях. Решена кристаллическая структура *EndoG* в комплексе с ее ингибитором *EndoGI* [83].

*EndoG* из *Drosophila*, как и другие эукариотические *EndoG*, существуют в виде гомодимера. В кристаллической структуре два мономера *EndoG* связаны одной молекулой *EndoGI* (рис. 9). Два мономера *EndoG* формируют компактный димер и располагаются между двумя доменами *EndoGI*. Двухдоменный белок *EndoGI* контактирует с активными центрами двух мономеров *EndoG*.

*EndoG* принадлежит большому семейству неспецифических  $\beta\beta\alpha$ -металл-эндонуклеаз. Сравнение эндонуклеаз выявило, что смешанная  $\alpha\beta$ -структура *EndoG* близка к *NucA* из *Anabaena sp.* [82] и эндонуклеазе *Sm* [62]. Эндонуклеаза *EndoG*

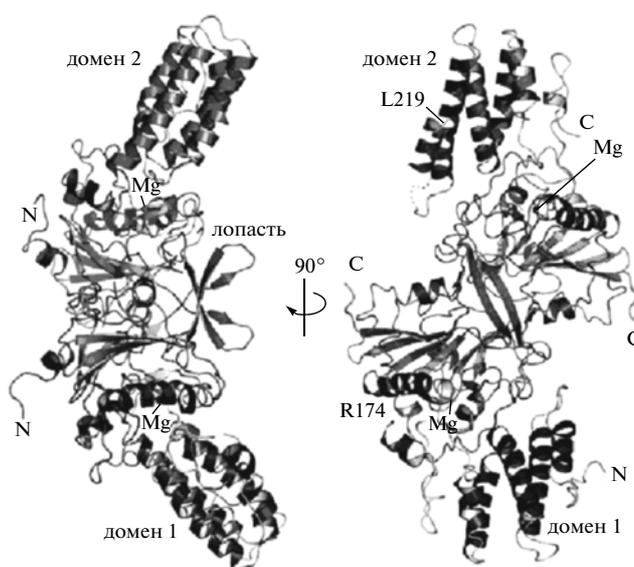


Рис. 9. Структура комплекса *EndoG/EndoGI* [83].

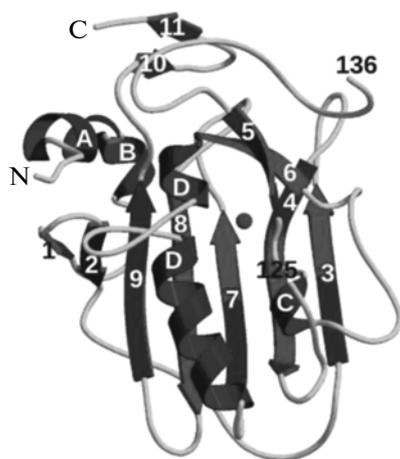


Рис. 10. Пространственное строение эндонуклеазы EndA [84].

так же, как родственные бактериальные эндонуклеазы, содержит центральный скрученный антипараллельный  $\beta$ -лист, состоящий из шести  $\beta$ -лент, фланкированный спиралями, и второй  $\beta$ -лист, сформированный двумя лентами. Но в отличие от бактериальных нуклеаз существует третий небольшой  $\beta$ -лист из двух антипараллельных  $\beta$ -лент ("лопасть", *wing*), который выдается из глобулярного домена. Эти лопасти объединяются и формируют в димере межмономерный  $\beta$ -лист. Дополнительно остатки петель из пограничных областей вносят свой вклад в образование димера. Интерфейс в домене в основном гидрофильный, здесь находятся и две полости, заполненные водой.

Неспецифическая эндонуклеаза EndA служит вирулентным фактором для инфекции *Streptococcus pneumoniae*. Роль EndA как вирулентного фактора при наличии пневмококковой инфекции делает эту эндонуклеазу привлекательным объектом для исследований в области антимикробной терапии. Проведено рентгеноструктурное исследование кристаллической структуры  $\beta\beta\alpha$ -металл-нуклеазы EndA из *S. pneumoniae* при разрешении 1.75 Å (рис. 10) [84]. Сравнение структуры EndA с другими нуклеазами того же семейства выявило консервативное ядро с  $\beta$ -листом и  $\beta\beta\alpha$ -металл фрагментом, формирующими каталитический центр. Кроме этих консервативных элементов вторичной структуры существует лишь минимальное подобие структурам других нуклеаз этого суперсемейства. При сравнении пространственных структур эндонуклеаз EndA и Sm значения r.m.s.d. координат равны 2.9 Å (по 137 из 235  $\alpha$ -атомам). В этом сопоставлении структур только 18.2% совмещаемых атомов боковых цепей проявляют соответствующий консерватизм боковых цепей. По сравнению с другими  $\beta\beta\alpha$ -ме-

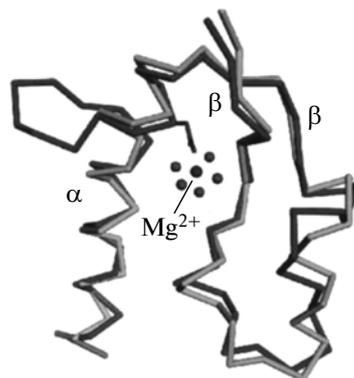


Рис. 11. Суперпозиция фрагментов структур эндонуклеазы EndA (более темная) и Sm (более светлая), содержащих мотивы  $\beta\beta\alpha$ -металл. Ионы магния и молекулы воды изображены в виде сфер [84].

талл-нуклеазами EndA показывает значительное отличие в локализации N-конца фермента. Одним из заметных различий между EndA и другими  $\beta\beta\alpha$ -металл-нуклеазами является существование петли на конце  $\alpha$ -спирали (рис. 11).

#### 2.4. Активный центр неспецифических эндонуклеаз

Активные центры рассмотренных в настоящей работе неспецифических эндонуклеаз имеют общую топологию, несмотря на различия (иногда существенные) пространственного строения белковых молекул. Активный центр содержит две антипараллельные  $\beta$ -ленты, одну  $\alpha$ -спираль и двухвалентный ион металла, локализованный между ними. Активный центр характеризуется DRGH-мотивом аминокислот, являющимся консервативным для этих нуклеаз.

Эндонуклеаза Sm. В области активного центра этого фермента расположены восемь аминокислотных остатков, шесть из которых — Arg57, Asp86, His89, Gln114, Asn119, Glu127 — консервативны для всего семейства ДНК/РНК-неспецифических гомологичных эндонуклеаз, а два — Asn106 и Glu120 — вариабельны. О роли в катализе различных аминокислотных остатков нуклеазы Sm можно судить по результатам исследования влияния точечных мутаций остатков нуклеазы на ее активность [58, 60]. Было показано, что замены His26Ala, His45Ala, Asp117Ala, Asp208Ala не влияют на каталитические свойства эндонуклеазы Sm, и обнаружено значительное снижение активности для мутантных форм нуклеазы, модифицированных в позициях 57, 86, 87, 89, 119, 127, 131, 211 аминокислотной последовательности.

Согласно данным сайт-направленного мутагенеза эндонуклеазы Sm, наибольшей каталитической значимостью обладают остатки Arg57,

Asp86, His89 и Glu127. Мутагенез этих остатков сопровождается резким падением каталитических свойств фермента. Наиболее важными остатками являются His89 и Asn119. Активность мутантов по этим позициям очень низкая (почти полностью подавляется).

Аминокислотные остатки активного центра выполняют различные функции. Остатки Asp86, Gln114, Asn119, Glu127, Asn106 и Glu120 эндонуклеазы *Sm* вовлечены во взаимодействия с водно-магниевым кластером — кофактором фермента (рис. 12). Ион магния окружен пятью молекулами воды и координирован карбоксильным атомом кислорода боковой цепи остатка Asn119. Магний-водный кластер имеет октаэдрическую конфигурацию. Упомянутые аминокислотные остатки связаны водородными связями с молекулами воды водно-магниевого кластера (рис. 12). Поскольку все остатки, контактирующие с водно-магниевым комплексом, инвариантны для всех белков семейства нуклеазы *Sm*, можно предположить, что водно-магниевый кластер сам по себе является консервативным элементом структуры ферментов с подобным мотивом строения активного центра. Многосторонние множественные взаимодействия необходимы для обеспечения связывания и правильного позиционирования магниевого кофактора относительно атомов каталитически важных остатков фермента [81]. Области активных центров в мономерах, объединенных в димер, удалены друг от друга и расположены в больших полостях на поверхности каждой субъединицы димерной молекулы белка.

Эндонуклеаза *NucA*. Структурная модель ДНК/РНК неспецифической эндонуклеазы *NucA* из *Anabaena sp.* PCC7120 [80], полученная на основе трехмерной структуры схожей эндонуклеазы *Sm*, предполагает, что общая архитектура активного центра, включая аминокислотные остатки N124, N155 и E163 (H89, N119 и E127 соответственно в эндонуклеазе *Sm*), подобна в обеих нуклеазах (рис. 7). Согласно результатам мутационного анализа участвующих в ферментативном катализе аминокислотных остатков нуклеазы *NucA*, замена этих остатков аланином приводит к большому спаду активности (<0.1%), как это наблюдалось и для нуклеазы *Sm*. Это показывает, что оба фермента имеют схожий механизм катализа, различаясь в деталях. Авторы [80] подчеркивают, что мутанты N155A и N124A имеют 10–100-кратное увеличение активности по сравнению с соответствующими мутантами N119A и H89A нуклеазы *Sm*. С другой стороны, мутант E163Q нуклеазы *NucA* примерно на один порядок менее активен, чем соответствующий ему E127Q нуклеазы *Sm*. Это могло быть следствием того, что эти каталитические остатки имеют несколько различное окружение, но, вероятно, не означает, что их специфические роли также различаются [80].

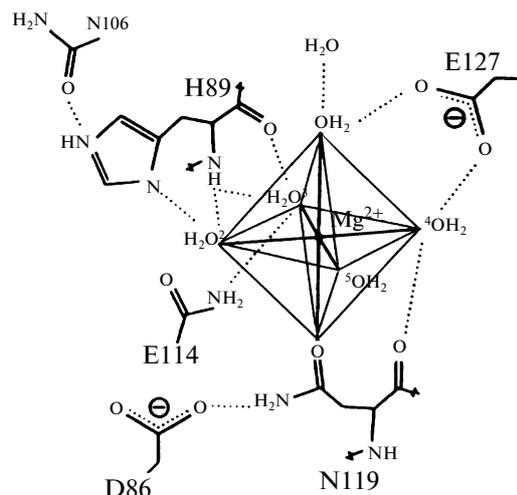


Рис. 12. Схема активного центра эндонуклеазы *Sm* [70].

В нуклеазе *Sm* аминокислотный остаток N119 — лиганд иона металла, а D86 соединен водородной связью с N119 [70, 85]. На основании мутационного анализа авторы [80] предполагают, что взаимодействие N155 и D121 (аналоги N119, D86 в *Sm* нуклеазе) также важно для координации двухвалентного металлического иона, являющегося кофактором в *NucA*, хотя по сравнению с остатком D86 нуклеазы *Sm* остаток D121 в *NucA* при замене его на аланин или аспарагин показывает более выраженное уменьшение активности.

Эти две сравниваемые нуклеазы максимально активны при различных двухвалентных катионах. Хотя эндонуклеаза *Sm* является более активной с  $Mg^{2+}$ , чем с  $Mn^{2+}$ , в то время как для *NucA* верно обратное [63, 64, 77], их сайты связывания ионов металла, по-видимому, различаются лишь в деталях. Авторы [80] полагают, что остаток D121 в *NucA* более важен для позиционирования N155, чем его аналог D86, позиционирующий N119 в эндонуклеазе *Sm*.

Все структуры неспецифических эндонуклеаз, как отмечено выше, в активном центре содержат консервативный структурный фрагмент, включающий в себя две антипараллельных  $\beta$ -ленты,  $\alpha$ -спираль и двухвалентный ион металла, локализованный между ними. Этот фрагмент включает в себя мотив Asp-Arg-Gly-His (DRGH), наличие которого в активном центре присуще неспецифическим эндонуклеазам. Кроме этих консервативных для каталитического центра элементов вторичной структуры существует минимальное подобие между структурами нуклеаз из этого суперсемейства. Подобная  $\beta\beta\alpha$ -металл-топология полости удлиненной формы в каталитическом ядре кроме описанных выше эндонуклеаз выявлена в областях активного центра хоминг-эндонуклеазы I-*PpoI*, EndoVII, ColE7, ColE9.

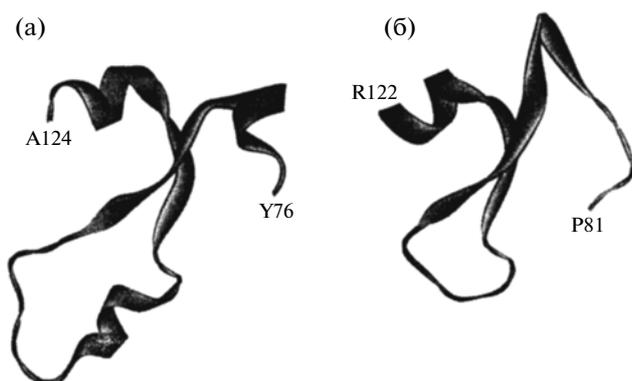


Рис. 13. Топология фрагментов вторичных структур эндонуклеаз *Sm* (а) и *I-PpoI* (б) [81].

Среди них *I-PpoI* является единственной специфической эндонуклеазой.

Эндонуклеаза *Sm* содержит 245 аминокислотных остатков, а *I-PpoI* — 163 остатка. Несмотря на кардинальные различия в общей пространственной топологии нуклеаз *Sm* и *I-PpoI* и отсутствие сходства первичных структур белков, суперпозиция их пространственных структур при одновременном сопоставлении только одного из мономеров димерных молекул каждого из белков выявляет значительные перекрытия  $\alpha$ -атомов полипептидных цепей в участках 76–124 и 81–122 для нуклеаз *Sm* и *I-PpoI* соответственно с незначительными вариациями в размерах некоторых петель, свидетельствуя о близости топологий активных центров ферментов (рис. 13). Кроме того, они имеют сходную геометрию каталитической части активного центра. В активном центре обе нуклеазы содержат  $Mg^{+2}$ -кофактор, в обоих ферментах в координации кофактора (иона магния) принимает участие кроме молекул воды только один аминокислотный остаток. Каталитические остатки аспарагина (Asn119 в обоих ферментах), гистидина (His89 в *Sm* и His98 в *I-PpoI*) и аргинина (Arg57 для *Sm* и Arg61 для *I-PpoI*) и водно-магниевый кластер консервативны, а при их суперпозиции значения r.m.s.d равны 0.66 Å [85] (рис. 14).

Суперпозиция между областями вторичных структур каталитического центра в неспецифических эндонуклеазах и специфической нуклеазе *I-PpoI* [75] показала хорошее соответствие между  $\beta\beta\alpha$ -металл-мотивами сравниваемых эндонуклеаз. Совмещение показывает, что остаток гистидина (His89 в *Sm*, His98 в *I-PpoI*) строго консервативен для этих эндонуклеаз, несмотря на низкую гомологию их первичных последовательностей. Мутация соответствующего гистидина (His89 в *Sm*, His98 в *I-PpoI*) в других неспецифических эндонуклеазах дает неактивный мутант, что под-

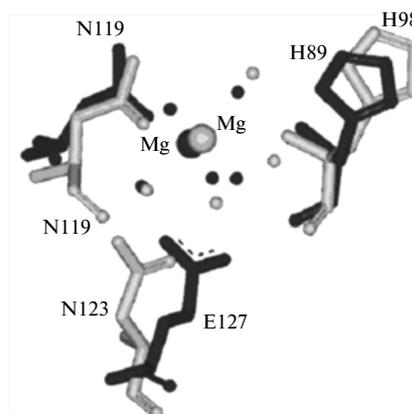


Рис. 14. Суперпозиция активных центров субъединиц эндонуклеаз *Sm* (темная) и *I-PpoI* (светлая).

тверждает значимость этого остатка при гидролизе ДНК.

#### 2.5. Механизмы регуляции каталитической активности неспецифических эндонуклеаз

Как отмечалось ранее, эндонуклеаза бактерий *Serratia marcescens*, проявляющая широкую субстратную специфичность, — одна из наиболее изученных бактериальных нуклеаз. В [86, 87] установлены особенности регуляции ДНКазной активности эндонуклеазы *Sm* катионами магния, а также соединениями, содержащими катионы ртути и кобальта, что приблизило понимание механизма регуляции активности эндонуклеазы *Sm* в целом. В дальнейшем результаты [88] дополнили информацию о механизмах регуляции активности *Sm* эндонуклеазы, важную для формирования объективных представлений о функционировании данного фермента вне и внутри клетки. Отсутствие таких знаний всегда ограничивает эффективность и сферы применения фермента и препятствует его дальнейшему продвижению в практику.

В [88] был изучен механизм регуляции активности эндонуклеазы *Sm* катионами магния, согласно которому  $Mg^{2+}$ , образуя комплексы с фосфатными группами субстрата, вызывает независимо от степени полимерности и спирализации субстрата такое изменение его вторичной структуры, которое приводит к многократному возрастанию скорости продуктивного распада комплекса фермент–субстрат. Установлено, что в отсутствие  $Mg^{2+}$  эндонуклеаза проявляет специфичность к типу гидролизующего субстрата. Также в [88] показано, что независимо от конформационных особенностей, степени полимерности и спирализации субстрата прочность связывания эндонуклеазы с субстратом постоянна и не зависит от наличия в среде катионов магния. Нуклео-

зидмонофосфаты не влияли на активность эндонуклеазы по отношению к ДНК и подавляли активность по отношению к РНК, ингибируя фермент по бесконкурентному типу в случае цитидинмонофосфата (ЦМФ), гуанозинмонофосфата (ГМФ), уридинмонофосфата (УМФ) и частично конкурентному типу в случае аденозинмонофосфата (АМФ) и дезоксиаденинмонофосфата (дАМФ). Было установлено, что дезоксирибонуклеозидтрифосфаты не влияли на активность эндонуклеазы ни по отношению к ДНК, ни к РНК, а цитидинтрифосфат (ЦТФ), гуанозинтрифосфат (ГТФ), уридинмонофосфат (УМФ) – только к ДНК, и подавляли активность РНК. Оказалось, что аденозинтрифосфат (АТФ) ингибирует эндонуклеазу в присутствии ДНК, а в присутствии РНК активирует фермент по частично смешанному типу. Предложены механизмы регуляции активности эндонуклеазы мононуклеотидами, различающимися типом азотистых оснований, углеводного остатка и числом фосфатных групп.

Суть механизмов регуляции активности эндонуклеазы мононуклеотидами заключается в следующем. Мононуклеотиды могут служить эффекторами эндонуклеазы, регулируя ее активность, предпочтительно по отношению к РНК, по частично конкурентному, бесконкурентному или частично смешанному типу, что зависит от их содержания в среде и химического состава, а также содержания в среде  $Mg^{2+}$ . Была исследована активность эндонуклеазы *Sm* при разных соотношениях фермента и субстрата в растворах. В результате сделано предположение о том, что изменение активности может быть связано с изменением уровня структурной организации молекул (известно, что эндонуклеаза *Sm* образует димеры) [88]. В дальнейшем исследования методом гель-хроматографии ферментных растворов, включающих эндонуклеазу в разной концентрации, позволили заключить, что уровень структурной организации эндонуклеазы зависит от ее содержания в растворе, а в мономерном состоянии эндонуклеаза проявляет более высокую ферментативную активность, чем в виде олигомеров.

Как было установлено в [89], для активности фермента *Sm* определенную роль играют две дисульфидные связи, существующие в мономере, которые формируются в окисляющейся среде периплазмы *Serratia marcescens*. Это защищает бактериальную клетку от потенциально токсичной внутриклеточной нуклеазной активности, предшествующей секреции. Авторы [89] сайт-направленным мутагенезом выясняли роль двух дисульфидных связей в *Serratia marcescens* эндонуклеазе и пришли к выводу, что существование этих связей важно для нуклеазной активности. Фермент теряет активность даже при мутации одного цистеина. Одна из ролей дисульфидных связей за-

ключается в том, чтобы увеличить стабильность белка. Все мутанты менее стабильны. Еще одна роль дисульфидных мостиков, по-видимому, заключается в стимуляции правильного свертывания фермента для проявления полноценной активности нуклеазы, но только после того, как она достигает внецитоплазматической окружающей среды.

В *NucA* нет дисульфидных связей, которые могли бы предотвратить активность нуклеазы в клетке. Вместо этого *NucA* находится в паре со специфическим ингибитором *NuiA*, защищающим клетку от нуклеазной активности, формируя очень стабильный комплекс *NucA–NuiA*, трехмерная структура которого определена.

Вопросы ингибирования эндонуклеазы *NucA* рассмотрены в [80]. Эндонуклеаза *NucA* ингибируется специфическим полипептидным ингибитором со значением  $K_i$  в “субпиколярном” диапазоне. Чтобы узнать, может ли *NuiA* ингибировать схожую нуклеазу *Sm*, был проведен равновесно-кинетический анализ расщепления ДНК спермы сельди с высокой молекулярной массой в присутствии рекомбинантного *NuiA*. Ранее [77, 90] было показано, что эндонуклеаза *Sm* не ингибируется в эквимольных количествах или умеренно высоком избытке *NuiA*. В [80] продемонстрировано, что эндонуклеаза *Sm* может быть ингибирована *NuiA*, но ингибирование эндонуклеазы *Sm* посредством *NuiA* при соотношении концентраций 1 : 1000.

*NucA* и *NuiA* формируют стабильный 1 : 1 комплекс [77]. Чтобы получить представление о механизме ингибирования *NucA* посредством *NuiA*, было проверено несколько мутантов *NucA* (мутировались аминокислотные остатки активного центра) [80]. Исследования показали, что активность мутантов достаточна для того, чтобы их чувствительность к ингибированию посредством *NuiA* могла быть измерена. Этот анализ демонстрирует, что аминокислотный остаток E163 нуклеазы *NucA*, который может участвовать в присоединении кофактора или протонировании уходящей группы субстрата, является ключевой аминокислотой при ингибировании фермента посредством *NuiA*. Остатки R93, R122 и R167 менее, чем E163, вовлечены во взаимодействия нуклеазы с *NuiA*, в то время как несколько других аминокислотных остатков, например D121, H124, N155 и W159, которые также расположены в активном центре этого фермента, по-видимому, практически не участвуют в этом взаимодействии. Нуклеотическая активность мутанта E163A ингибируется лишь приблизительно в 100-кратном молярном избытке *NuiA* по отношению к этому мутанту нуклеазы. Комплекс между E163A и *NuiA* хоть и менее устойчив, чем комплекс дикого типа *NucA–NuiA*, все же может быть обнаружен гель-хроматографией. Авторы пред-

полагают, что с аминокислотным остатком E163 из NusA связываются положительно заряженные аминокислотные остатки из NuiA, в то время как аргинины могут связаться с отрицательно заряженными остатками NuiA. Замена одного из заряженных остатков NusA аланином ослабляет взаимодействие между ферментом и ингибитором.

Серия из семи аналогов NuiA с усеченными N- (A1-21) и C-концевыми (A134-135, A132-135, A131-135, 128-135) остатками и заменой единичных аминокислот (K131A, K131R) использовалась в исследованиях авторами [80].

Наблюдаемое уменьшение степени ингибирования NusA аналогами, усеченными с C-конца, с точки зрения авторов, объясняется тем, что потеря функции ингибирования связана с изменениями во вторичной структуре (так называемое “missfolding”). Чтобы определить структурную идентичность аналогов NuiA, были выполнены CD-спектроскопические измерения, показавшие, что степень “усечения” C-концевого участка коррелировала с изменениями вторичной структуры.

На основании исследования различных мутантов авторы [80] предположили, что поскольку остаток E163 NusA важен для ингибирования NusA посредством NuiA, то положительно заряженный остаток, например K131, расположенный в C-концевом фрагменте NuiA, целостность которого важна для ингибирующей функции NuiA, мог бы взаимодействовать с этим отрицательно заряженным остатком активного центра. Мутантные формы NuiA—K131A и K131R, однако, вели себя как дикий тип NuiA, ингибируя активность NusA при эквимольных концентрациях и формируя 1 : 1 комплекс в экспериментах гель-фильтрации.

Не были идентифицированы заряженные остатки NuiA, вовлеченные во взаимодействия с NusA, но авторы предположили, что N- и C-концевые фрагменты NuiA вовлечены во взаимодействия, поскольку аналоги NuiA с усеченными N- и C-концами теряли способность ингибировать нуклеотическую активность NusA. Тот факт, что у этих “усеченных” мутантов изменена вторичная структура, может также означать, что N- и/или C-концевые фрагменты только косвенно вовлечены во взаимодействие NusA—NuiA. Исследования привели к выводу, что остаток активного центра E163 эндонуклеазы NusA предположительно является ключевым для ингибирования NusA посредством NuiA. Аминокислотные остатки R93, R122 и R167 также вовлечены во взаимодействие NusA—NuiA.

Активность эндонуклеазы Sm, как отмечалось выше, ингибируется при высоких молярных избытках NuiA при наномолярных концентрациях нуклеазы, что указывает на возможность формирования комплекса между этими двумя белками. Однако этот комплекс не достаточно устойчив,

чтобы его можно было обнаружить в экспериментах гель-фильтрации.

Для эндонуклеазы EndoG общий механизм ингибирования — сокрытие EndoG в отдельном отделе клетки с запретом ее функционирования или связывание нуклеазы с белковым ингибитором EndoGI, представляющим собой двухдоменный белок, который связывает активные центры двух мономеров EndoG (рис. 9).

### 3. СТРУКТУРНЫЙ МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ СПЕЦИФИЧЕСКИХ И НЕСПЕЦИФИЧЕСКИХ ЭНДОНУКЛЕАЗ

Ферментативные реакции в отличие от многообразных гомогенных или гетерогенных каталитических превращений протекают в обладающей относительной конформационной подвижностью системе, которая содержит субстрат, кофакторы и должным образом ориентированные функциональные группы белка, обеспечивающие образование или разрыв ковалентных связей в субстрате. Рассмотрение молекулярных механизмов каталитического расщепления фосфодиэфирных связей НК требует описания как минимум трех основных ключевых процессов: активации атакующего разрываемую связь нуклеофила, стабилизации переходного состояния фосфоаниона, протонирования уходящей группы. Структурные исследования ферментов выявляют возможность той или иной необходимой, но недостаточной механистической предпосылки, являющейся основой реализации этих основополагающих химических постулатов.

#### 3.1. Специфические эндонуклеазы

Существует большое количество структурных данных для семейства ЭР типа II, большинство из которых характеризуется PD...(D/E)XK-мотивом, используемым при описании каталитического центра и сайта связывания ионов металла. Имеющиеся сведения о пространственном строении ферментов и их комплексов чрезвычайно полезны для понимания взаимодействий НК с белком, но это еще не позволяет сформулировать общий механизм гидролиза этими ферментами фосфодиэфирной связи. Камнем преткновения является переменное число двухвалентных ионов металла (обычно Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, или Mn<sup>2+</sup>), наблюдаемых в различных комплексах ДНК-ферментов. У нескольких ферментов, пространственные структуры которых известны, нет никакого двухвалентного иона металла, связанного с активным центром, несмотря на то, что двухвалентные ионы металла присутствовали при кристаллизации, некоторые имеют один двухвалентный ион металла на активный центр, а другие — два. Эти факты вызвали предположение, что в пределах

семейства эндонуклеаз рестрикции PD...(D/E)XK часть ферментов следует механизму, для которого необходимы два иона металла, тогда как другие ферменты нуждаются лишь в одном двухвалентном ионе металла для осуществления катализа [91, 92]. Количество и местоположение двухвалентных ионов металла разнятся в зависимости не только от иона металла и присутствия аминокислот, претерпевших изменение при мутации, но и от укладки молекул в кристаллической решетке [93].

Анализом имеющихся структурных данных авторы [28] показали, что эндонуклеазы BamHI, NgoMIV и NotI имеют по два двухвалентных иона металла, связанных с активным центром, а BglII и EcoRI только по одному иону (рис. 2). В структурах SgrAI локализован один ион  $\text{Ca}^{2+}$  в активном центре комплекса с неузнаваемым субстратом в отличие от двух  $\text{Ca}^{2+}$  в активном центре комплекса с узнаваемым субстратом. Авторы [28] задались вопросами, может ли число ионов двухвалентных металлов, наблюдаемых в комплексах ферментов, быть подтверждением количества  $\text{Mg}^{2+}$ , необходимого для катализа. Соответственно имеют ли эти ферменты схожий каталитический механизм гидролиза фосфодиэфирных связей? Насколько необходимы два двухвалентных иона металла для катализа?

В [28] изучено, как концентрация  $\text{Mg}^{2+}$  и  $\text{Mn}^{2+}$  влияет на расщепление ДНК эндонуклеазами рестрикции типа II семейства EcoRI: BamHI, BglII, Cfr10I, EcoRI, EcoRII-C, MboI, Ngo-MIV, PspGI и SsoII. Члены этого семейства, как было показано, имели один или два двухвалентных иона металла на активный центр в кристаллической структуре соответствующего комплекса фермент-ДНК. Зависимость скорости расщепления ДНК от концентрации  $\text{Mg}^{2+}$  и  $\text{Mn}^{2+}$  определяли в диапазоне концентрации  $\text{Me}^{2+}$  от 0 до 50 мМ.

Полученные результаты наряду с результатами исследований кристаллических структур комплексов фермент-субстрат и фермент-продукт позволили авторам [28] предположить, что существуют два сайта связывания для двухвалентных металлических ионов: каталитический сайт, важный для осуществления катализа, и второй, который является необязательным. Второй сайт может модулировать эффективность катализа в зависимости от того, занят ли он ионом  $\text{Mg}^{2+}$  ( $\text{Mn}^{2+}$ ) или  $\text{Ca}^{2+}$ . Был предложен механизм с участием одного иона металла для связывания и расщепления ДНК. Второму иону металла отведена модуляторная роль. При высоких концентрациях активность может уменьшиться в случае  $\text{Mg}^{2+}$  ( $\text{Mn}^{2+}$ ) (из-за увеличения  $K_M$ ) или увеличиться в случае  $\text{Ca}^{2+}$ . Так как ионы  $\text{Ca}^{2+}$  главным образом стабилизируют закрепление пентавалентного переходного состояния, но не способствуют рас-

щеплению химической связи, то присутствие двух  $\text{Ca}^{2+}$  является ингибирующим для реакции.

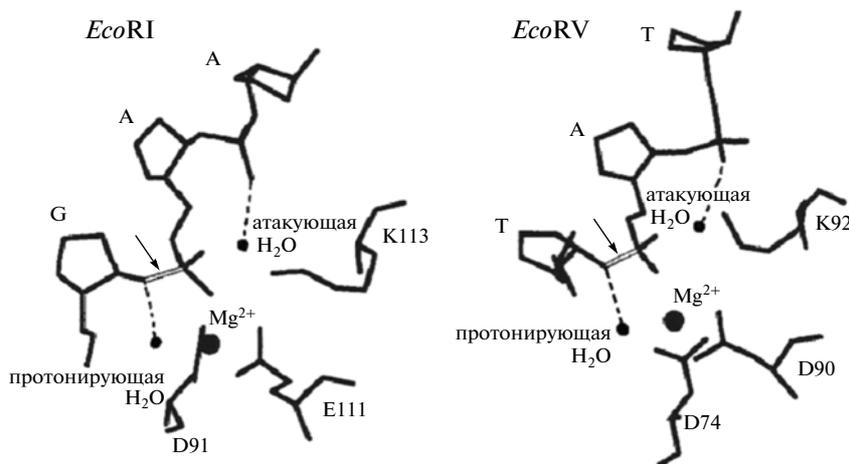
Разная степень стимуляции процесса катализа ионом  $\text{Ca}^{2+}$ , изменяющаяся для различных ферментов, зависящих от концентрации  $\text{Mg}^{2+}$  (или  $\text{Mn}^{2+}$ ), может быть объяснена относительным сродством двухвалентных ионов металлов для двух сайтов связывания металла и относительными показателями степени расщепления ДНК, зависящими от занятости сайтов [28].

Авторы [28] полагают, что этот механизм расщепления ДНК ферментами семейства EcoRI – механизм с двумя или одним металлом в зависимости от концентрации двухвалентных металлических ионов и субстрата – можно было бы перенести на ЭР семейства EcoRV (например, BglII, EcoRV, HincII, MspI, MvaI и PvuII) и другие нуклеазы (например, MutH), для которых есть данные о кристаллических структурах комплексов фермент-субстрат и фермент-продукт с одним или двумя двухвалентными ионами металла.

В [34] анализируется структурное подобие между эндонуклеазами SfiI и BglII, на основании которого авторы делают вывод о том, что оба фермента имеют схожие механизмы расщепления ДНК. В исследованных кристаллах эндонуклеазы SfiI и BglII имеют разное количество ионов металла в активном центре (один и два соответственно) (рис. 3). По мнению авторов, состояние активного центра в SfiI, вероятно, отражает фиксацию SfiI в неактивном промежуточном состоянии, в котором расщепляемая фосфодиэфирная связь расположена далеко от остатков активного центра. Связывание второго иона металла означает активацию SfiI. Фосфодиэфирная связь и остатки активного центра приближаются друг к другу для катализа (рис. 3).

В кристаллической структуре HindIII [30] присутствие двух ионов металла вблизи расщепляемой фосфодиэфирной связи в структуре кристаллов, вымоченных в растворе, содержащем ионы  $\text{Mg}^{2+}$ , позволило авторам однозначно определить каталитический механизм как двухатомный [54, 94, 95]. Расстояние между двумя ионами металла равно 3.98 Å, что находится в соответствии с моделью переходного состояния согласно двухатомному механизму. Авторы отмечают, что металлы оказались разными ( $\text{Mg}^{2+}$  и  $\text{Mn}^{2+}$ ), хотя кристаллы были вымочены с  $\text{Mg}^{2+}$  (рис. 4).

Как показано в [96, 97], гидролиз фосфодиэфирных связей эндонуклеазой EcoRI и EcoRV сопровождается инверсией связей на атоме фосфора, что является результатом атаки молекулы воды *in-line*. В результате расщепления ДНК эндонуклеазами рестрикции возникают 3'-ОН конец уходящей группы и 5'-фосфат. В комплексах EcoRI, EcoRV, PvuII, BamHI два консервативных аминокислотных остатка (кислотные) являются



**Рис. 15.** Структуры каталитических центров *EcoRI* и *EcoRV*. Стрелками показаны разрывающиеся фосфодиэфирные связи [47].

лигандами иона  $Mg^{2+}$ , который также связан с фосфатной группой, подвергающейся атаке. Этот катион пригоден для компенсации отрицательного заряда на фосфатной группе. Функция льюисовской кислоты может быть приписана “полу-консервативному” остатку лизина. Геометрия всех этих комплексов фермент–ДНК–металл такова, что одна молекула воды из гидратной сферы  $Mg^{2+}$  близко приближается к кислороду уходящей группы лиганда, и авторы [47] полагают, что молекула воды из внутренней гидратной сферы иона магния может протонировать уходящую группу (рис. 15) [98].

### 3.2. Неспецифические эндонуклеазы

Для объяснения механизма расщепления ДНК, катализируемого ферментом, неоценимую роль играют знания структурной основы каталитического действия фермента, которые дают рентгеноструктурные исследования кристаллических структур неспецифических эндонуклеаз в комплексах с субстратом или продуктом реакции. Для *Sm*-эндонуклеазы структурные данные о каких-либо взаимодействиях фермента с нуклеотидными субстратами отсутствуют. Несмотря на это, авторы [85] использовали данные о кристаллических структурах интронкодируемой специфической хоминг-эндонуклеазы *I-PpoI* из *Physarum polycephalum* в комплексе с ДНК (без иона  $Mg^{2+}$ ), с продуктом расщепления ДНК (в присутствии иона  $Mg^{2+}$ ), а также комплекса His98Ala-мутантной эндонуклеазы *I-PpoI* с ДНК [43]. Они исходили из выраженного соответствия геометрий активных центров и структур водно-магниевых кофакторов эндонуклеаз *Sm* и *I-PpoI* и предположили, что вблизи расщепляемой связи ДНК может быть связана эндонуклеазой *Sm* сходным с

нуклеазой *I-PpoI* образом и что возможна реализация ферментами схожего для обоих белков химического механизма гидролиза фосфодиэфирных связей.

В нуклеазе *Sm*, как отмечалось ранее, ион  $Mg^{2+}$  координирован кислородом боковой группы остатка Asn119 и пятью молекулами воды. Аминокислотные остатки, участвующие в координации иона магния, консервативны для многих нуклеаз. В мутантной *I-PpoI*-эндонуклеазе ион  $Mg^{2+}$  координирован кроме Asn119 3'-кислородом ДНК, атомом кислорода фосфатной группы, а также тремя молекулами воды. В *I-PpoI*-нуклеазе с продуктами расщепления атом О фосфатной группы (уже концевой) не координирует атом Mg, смещаясь от него в сторону. Среди координирующих ион  $Mg^{2+}$  остается 3'О дезоксирибозного остатка нуклеотида. При наложении структур двух нуклеаз боковая группа остатка Arg57 нуклеазы *Sm* оказывается вблизи от расщепляемой фосфатной группы, а боковые группы остатков Arg131 и Arg87 – на оптимальном расстоянии для связывания соседних с расщепляемой фосфатных групп субстрата. На рис. 16 представлена схема взаимодействия нуклеотида с активным центром эндонуклеазы *Sm*, предложенная в [85].

Атом 3'О субстрата занимает позицию  $H_2O_c$  в координационной сфере магния. Механизм разрыва фосфодиэфирной связи показан стрелками. Вода  $H_2O_a$ , активированная гистидином His89, атакует фосфодиэфирную связь, которая в результате разрывается. *Sm* нуклеаза катализирует гидролиз фосфодиэфирных связей, который протекает в процессе нуклеофильного замещения у атома фосфора как реакция присоединения–отщепления с участием некоординированной ионом металла молекулы воды и образованием промежуточного пентакоординированного со-

единения, имеющего геометрию тригональной дипирамиды с атомом фосфора в центре и с подходящей и уходящей группами в вершинах пирамиды. Механизм нуклеофильного замещения предусматривает максимальный положительный заряд на центральном атоме фосфора в переходном состоянии в момент ухода заместителя в форме аниона.

Остаток гистидина His89 (His98 в *I-PpoI*) выступает в роли общего основного катализатора, забирая протон у молекулы воды растворителя и тем самым активируя ее для нуклеофильной атаки на атом фосфора, примыкающий к разрываемой связи, что сопровождается разрывом 3'О–Р-связи. Реакция сопровождается инверсией конфигурации у атома фосфора и осуществляется в соответствии с *in-line*-механизмом, когда атакующая молекула нуклеофила присоединяется со стороны, противоположной уходящей группе.

Внутренняя координационная сфера гидратированного магниевого кластера непосредственно вовлечена в процесс катализа, выполняя, как и остаток Asn119, функцию стабилизации промежуточного фосфорана и протонируя 3'-оксианион уходящей группы в качестве льюисовской кислоты. Тем самым стабилизируется отрицательный заряд на пентакоординированном фосфоре (в переходном состоянии) и на уходящей группе. Остатки аргинина участвуют в электростатической стабилизации субстрата и продуктов его гидролиза.

В [75], посвященной рентгеноструктурному анализу кристаллической структуры мутантного (His80Ala) комплекса эндонуклеазы *Ivn* с ДНК, предлагается каталитический механизм действия *Ivn* эндонуклеазы, в котором His80 функционирует как общее основание, активизирующее молекулу воды для *in-line*-атаки на “неустойчивый” фосфат вблизи разрываемой связи.  $Mg^{2+}$  стабилизирует переходное состояние, а молекула воды, связанная с  $Mg^{2+}$ , снабжает протоном 3'О уходящей группы. Предполагаемый для эндонуклеазы *Ivn* каталитический механизм, типичный однометаллический ионный механизм, подобен тому, что предложен для *I-PpoI* и эндонуклеазы *Sm*.

При переходном состоянии аминокислотный остаток Arg99 эндонуклеазы *Ivn* стабилизирует продукт, образуя водородную связь с “неустойчивой” фосфатной группой. Остаток Arg61 в *I-PpoI* ведет себя аналогичным образом, а именно, в комплексе фермент–продукт отщепленный 5'-фосфат смещается, и формируется водородная связь с Arg61.

Авторы [80] на основании результатов мутационного анализа каталитически важных аминокислотных остатков эндонуклеазы *Anabaena* считают, что *NucA* следует по тому же механизму гидролиза фосфодиэфирных связей, что и нуклеаза

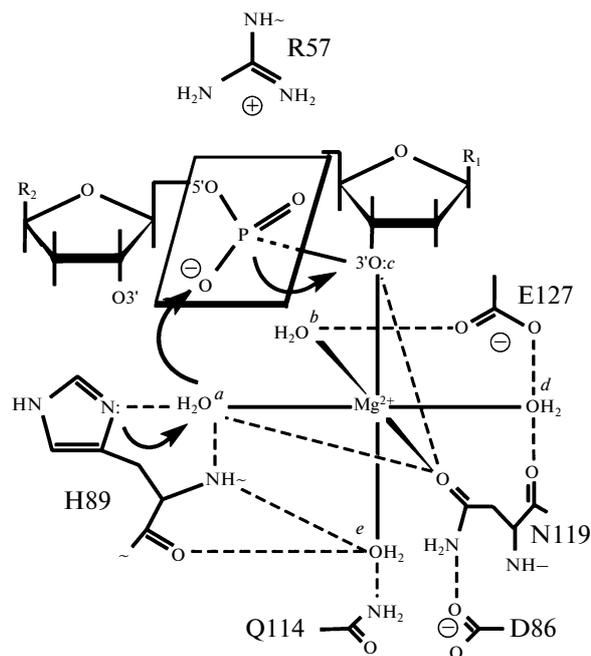


Рис. 16. Схема активного центра эндонуклеазы *Sm* с фрагментом молекулы ДНК [85].

*Sm* [85] лишь с различиями в деталях. Остаток E127 образует водородные связи с двумя молекулами воды из координационной сферы  $Mg^{2+}$ , из чего авторы [80] делают вывод, что молекула воды из внутренней сферы  $Mg^{2+}$ , а не непосредственно E127 служит цели присоединения протона к уходящей группе. Остаток R57 нуклеазы *Sm*, чья функция заключается в том, чтобы стабилизировать пентавалентное переходное состояние, имеет аналог в интронкодируемой хоминг-эндонуклеазе *I-PpoI*. Его структурный аналог в *NucA* — это D95. Отрицательно заряженный остаток D95 мог бы также стабилизировать переходное состояние, образуя водородные связи. Механизм разрыва фосфодиэфирной связи нуклеазой *Anabaena*, предложенный авторами [47, 99] на основании мутационного анализа и сравнения с эндонуклеазами *Sm* и *I-PpoI*, показан на рис. 17.

Каталитический механизм гидролиза фосфодиэфирных связей эндонуклеазой *EndA*, по мнению авторов [84], подобен предложенному для эндонуклеаз *Sm* [70, 85] и *NucA* [82] (рис. 18). В соответствии с ним His160 (*EndA*) позиционирует и активирует молекулу воды для нуклеофильной атаки на “неустойчивый” фосфат. Остаток Asn191 непосредственно координирует ион металла в каталитическом центре, который вовлечен в стабилизацию фосфат-аниона в переходном состоянии. В данном исследовании несколько аминокислотных остатков на основании их близости к активному центру были заменены аланином. Результаты показали, что Asn202 не имеет явного

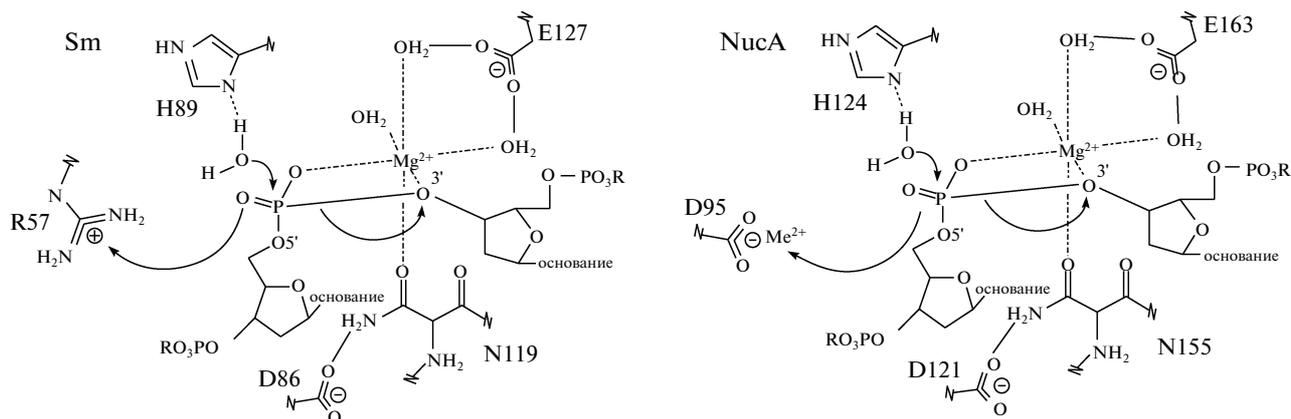


Рис. 17. Предполагаемый механизм каталитического действия эндонуклеазы NucA [80].

влияния ни на связывание ДНК, ни на катализ. Остатки His154, Gln186, Gln192 и Glu205 идентифицировались как каталитически важные, наиболее ключевой из них – Glu205. Исходя из структурного соответствия, Glu205 гомологичен Glu163 из NucA, Glu127 из Sm-эндонуклеазы и Glu195 из EndoG. Glu205 формирует водородные связи с двумя молекулами воды из координационной сферы  $Mg^{2+}$ , что, вероятно, важно для компоновки активного центра при катализе. Структурные исследования выявили, что Gln186 формирует водородную связь с другой молекулой воды из координационной сферы. Мутация Q186A не была так пагубна для катализа, как E205A, что связано, как полагают авторы [84], с тем, что Gln186 взаимодействует только с одной молекулой воды из внутренней координационной сферы двухвалентного иона. Остатки His154 и Gln192 расположены дальше от активного центра, и авторы описывают их как остатки второй координационной сферы активного центра.

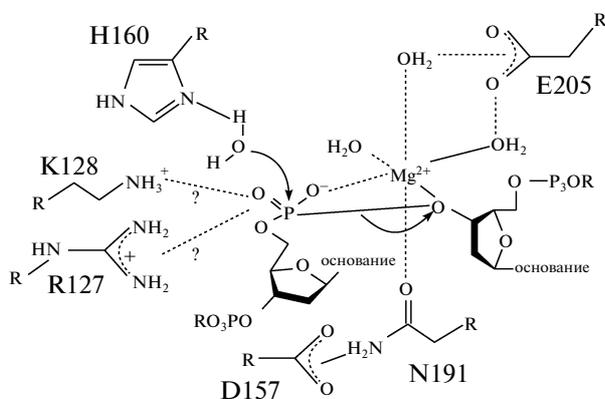


Рис. 18. Схема предполагаемого механизма катализа для EndA [84].

#### 4. МЕХАНИЗМ СВЯЗЫВАНИЯ СУБСТРАТА ЭНДОНУКЛЕАЗАМИ

##### 4.1. Специфические эндонуклеазы

Специфическое связывание фермента с субстратом вызывает взаимную подгонку в комплексе фермент–ДНК, которая обеспечивает требуемую близость и точную ориентацию всех групп, участвующих в катализе. Таким способом каталитические центры активизируются, и специфическое связывание проходит вместе с катализом в “духе близкого сотрудничества”.

Рентгеноструктурные исследования кристаллических структур специфической эндонуклеазы рестрикции HindIII в комплексах с узнаваемой ею ДНК с двухвалентными катионами и без них были проведены с разрешением 2.17 и 2.00 Å соответственно [30]. Эндонуклеаза HindIII распознает специфическую последовательность из шести пар оснований с симметрией второго порядка. Как показано в [30], фермент формирует прямые контакты только с основаниями из специфической последовательности в большом желобке. Какие-либо непосредственные контакты с основаниями неспецифической последовательности по обе стороны от участка узнаваемой последовательности отсутствуют. Конформация связанной ДНК искажена, существенно отличающаяся от идеальной структуры В-ДНК. Четыре аминокислотных остатка Asp120, Lys122, Asp123 и Lys125 спирали осуществляют взаимодействия в большом желобке. Остатки Glu60, Lys61, Ser56 и Arg88 взаимодействуют с ДНК в малом желобке. В большом желобке образуются водородные связи непосредственно или через молекулы воды между белком и основаниями специфической последовательности (A/AGCTT) ДНК.

В малом желобке подобные связи формируются со специфическими основаниями. Прямые взаимодействия HindIII с основаниями осу-

ществляются только с частью специфической последовательности и главным образом в большом желобке. Никаких прямых контактов с основаниями из неспецифической последовательности с обеих сторон узнаваемой последовательности установлено не было, хотя существует много взаимодействий между фосфатным остовом и белком в этих областях.

Наложение структур ДНК до и после реакции катализируемой *HindIII* показывает, что в общих чертах структуры ДНК почти одинаковы, но положение рибозного фрагмента аденозина 4А значительно смещается, когда фосфатный остов расщепляется, хотя позиция пуринового основания не меняется. Взаимодействия между Asn120 и аденином 4А вызывают отклонение пурина приблизительно на 25° от комплементарного ему тимина 9Т, что вызывает напряжения в структуре ДНК.

В [100] сообщаются результаты структурного и функционального анализа высоко специфической эндонуклеазы *I-PpoI* с целью определения изменений, происходящих в ферменте и ДНК при образовании комплекса. Авторы пришли к заключению, что хоминг-эндонуклеаза *I-PpoI* жестко связывается со своей мишенью в ДНК, в результате чего происходит значительная деформация малого и большого желобков вблизи фосфата, подвергаемого атаке. Наряду с большими искажениями в ДНК конформация фермента претерпевает незначительные изменения.

Большинство сайт-специфических ДНК-связывающих белков взаимодействует с высоким сродством не только в специфических сайтах связывания, но также с ощутимым сродством в неспецифических сайтах [47]. В связи с этим предполагается, что неспецифические взаимодействия играют важную роль в сайт-специфических ДНК-связывающих белках для нахождения нужной мишени. Биологическая функция ЭР основана на быстром расщеплении внедряемой фаговой ДНК. Расщепление должно произойти прежде, чем фаговая ДНК метилируется соответствующей метилтрансферазой, и прежде, чем она иницирует разрушительное действие в бактериальной клетке. Это требует очень быстрой локализации мишени, что не является легкой задачей, когда существует большое преимущество неспецифических сайтов ДНК над специфическими. Чтобы преодолеть эту проблему для ЭР, предлагается общая стратегия облегченного нахождения сайта мишени. Белок очень быстро неспецифически связывается с ДНК, а затем в процессе одномерной диффузии “сканирует” ДНК в поисках распознаваемого им сайта [47].

#### 4.2. Неспецифические эндонуклеазы

Эндонуклеаза *I<sub>np</sub>* — пример неспецифической периплазмической эндонуклеазы, кристаллическая структура мутантного (H80A) комплекса с ДНК была с разрешением 2.3 Å исследована в [75]. Эндонуклеаза *I<sub>np</sub>* образует связи с субстратом только в малом желобке ДНК. В результате дуплекс изгибается в направлении большого желоба приблизительно на 20°. Только фосфатный остов ДНК образует водородные связи с *I<sub>np</sub>*. Это дало основание авторам [75] считать, что такой факт можно рассматривать как структурную основу для понимания процесса связывания фермента с ДНК или РНК независимо от их нуклеотидной последовательности. По сравнению с другими неспецифическими ДНК-связывающими белками это необычно, так как, согласно [101], большинство из них связывается водородными связями с парами оснований ДНК в расширенном малом желобке. Авторы [75] считают, что неспецифически ДНК-связывающие белки, когда не требуется большой деформации ДНК, могут выбрать способ связывания с ДНК в малом желобке в основном для того, чтобы избежать любых зависящих от последовательности контактов в большом желобке. Таким образом, нуклеаза *I<sub>np</sub>* может связывать в малом желобке умеренно изогнутую ДНК с тем, чтобы избежать близких контактов с парами оснований ДНК и из-за того, что для деформации молекулы ДНК требуются большие затраты энергии. Для того чтобы удостовериться, что эта гипотеза справедлива в отношении неспецифических ДНК-связывающих белков, по-видимому, необходимо иметь большее количество структурных исследований кристаллических структур комплексов фермент–ДНК.

Неспецифические эндонуклеазы гидролизуют ДНК без специфики к последовательности, но иногда с некоторой селективностью. Однако структурный базис такого предпочтения остается неясным. Этой проблеме посвящена работа [49]. В основном считается, что неспецифические эндонуклеазы чувствительны к общим чертам ДНК, таким как ширина малой бороздки [102] и жесткость ДНК [103]. Локальные, зависящие от последовательности взаимодействия между нуклеазами и ДНК могут быть второстепенными определяющими факторами [104]. Но остается неясным, какие именно структурные особенности, являющиеся базовыми для ДНК, важны для этих ферментов. В [105] на примере двух неспецифических эндонуклеаз *CoI/E7* и *I<sub>np</sub>* рассмотрен вопрос, какие локальные структурные изменения в ДНК узнаются неспецифическими эндонуклеазами и являются определяющими для предпочтений при расщеплении ДНК. В работе обсуждаются кристаллические структуры мутантных эндонуклеаз N-*CoI/E7* (H545Q) и *I<sub>np</sub>* (H80A) в комплексах с олигонуклеотидами длиной 18 и 16

пар оснований ДНК соответственно, а также предпочтения при расщеплении последовательности эндонуклеазами *N-CoIE7* и *I<sub>in</sub>*.

На основе анализа предпочтений при расщеплении ДНК и структур комплексов фермент–ДНК авторы [105] предложили структурную основу для объяснения, почему неспецифические эндонуклеазы с некоторым предпочтением расщепляют ДНК в зависимости от последовательности. Они утверждают, что прежде всего искаженный остов ДНК, а не параметры стекинга пар оснований является главным локальным детерминантом, узнаваемым неспецифическими эндонуклеазами, для более эффективного расщепления фосфодиэфирной связи. Кристаллическая структура рассмотренного в [105] комплекса нуклеазы *CoIE7*, связанного с 18-ю парами оснований ДНК, расщепляет ДНК с предпочтением осуществления разреза после тиминовых оснований (со стороны 3'О) (комплекс с “предпочтением”), а периплазматическая эндонуклеаза *I<sub>in</sub>* разрезает ДНК более равномерно. Кристаллическая структура комплекса нуклеазы *CoIE7* с “предпочтением”, с тиминим перед “неустойчивым” фосфатом, имеет более искаженный фосфатный остов ДНК, чем остовы в комплексах без “предпочтения”, так что фосфат, подвергаемый атаке, композиционно располагается ближе к активному центру эндонуклеазы, в результате чего более эффективно проходит процесс расщепления ДНК. В кристаллической структуре *I<sub>in</sub>* комплекса с 16-ю парами оснований ДНК фосфатный остов схож с тем, что ранее фигурировал в комплексе *I<sub>in</sub>* с ДНК другой последовательности нуклеотидов, но не искажен по сравнению с ним. Полученные результаты позволили авторам [105] на структурной основе объяснить, как расщепление ДНК, катализируемое неспецифическими эндонуклеазами, зависит от ее последовательности. Неспецифические нуклеазы могут побуждать ДНК искажаться до характерного уровня, зависящего от локальной последовательности, что приводит к различным скоростям расщепления вдоль цепи ДНК.

Каково различие в процессе узнавания ДНК между сайт-специфическими ДНК-узнающими ферментами и неспецифическими? В неспецифических комплексах ДНК принимает каноническую неизогнутую В-ДНК-конформацию, тогда как в специфических комплексах она изгибается на ~36°. Кроме того, в специфических комплексах ДНК более скрывается в интерфейсе по сравнению с неспецифическим комплексом [105].

Только сайт-специфические ДНК-связывающие белки могут взаимодействовать с основаниями ДНК, когда они связываются со своими специфическими сайтами, и могут вызывать большие конформационные изменения в ДНК, что

приводит к распознаванию специфических черт ДНК и ее расщеплению.

Рестрикционные ферменты связываются с неспецифическими сайтами, взаимодействуя главным образом с остовом ДНК. Когда происходит связь со специфическим сайтом, то подобно сайт-специфическим ДНК-связывающим белкам ферменты рестрикции взаимодействуют и с остовом ДНК, и с его основаниями [10, 93].

Ключевым моментом, отличающим неспецифические эндонуклеазы от сайт-специфических, является то, что неспецифическим эндонуклеазам “недостает способности” взаимодействовать с основаниями ДНК. Как в случае рестрикционных ферментов, неспецифические эндонуклеазы, используют схожую стратегию при расщеплении ДНК с некоторым предпочтением последовательности. Прямые и опосредованные взаимодействия между ферментами рестрикции и специфическими ДНК инициируют большие конформационные изменения как в ферменте, так и в ДНК. В результате этого структура ДНК становится более искаженной, и фосфат, подвергаемый атаке, сдвигается ближе к активному центру фермента, в результате возникает “предпочтительное” расщепление ДНК [93]. Подобная картина наблюдается в структуре *CoIE7* [105], неспецифической эндонуклеазе, расщепляющей ДНК с некоторым предпочтением расщепляемой последовательности. В случае *CoIE7*, которая предпочитает расщеплять ДНК после Т или А, Т-А пара оснований, вероятно, более легко “открывается”, чем G-C, и фосфатный остов может легко деформироваться в результате изменения двугранных углов в фосфатном остове рибозы. Таким образом, неспецифические эндонуклеазы предпочитают разрывать связи в местах, где остов ДНК может быть более легко деформирован ферментом.

Таким образом, изменения в остове ДНК комплекса *N-CoIE7*–DNA не так радикальны, как в комплексах рестрикционный фермент–ДНК, однако их хватает, чтобы провести различия между “предпочтительными” и “непредпочтительными” сайтами связывания.

Авторы [105] делают вывод, что, хотя сайт-специфические и неспецифические ферменты взаимодействуют с ДНК по-разному, но, проводя различия между “предпочтительными” и “непредпочтительными” сайтами при расщеплении ДНК, они пользуются схожими стратегиями изменения конформации остова ДНК.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Среди всех известных к настоящему времени специфических эндонуклеаз наиболее изученными являются эндонуклеазы рестрикции (главным образом типа II), способные узнавать специфиче-

ские последовательности нуклеотидов на ДНК и разрезать ее по определенным положениям. Несмотря на несхожесть первичных последовательностей и структур, эндонуклеазы рестрикции, как показано в [10], содержат “ядро”, включающее пятиленточный смешанный  $\beta$ -лист, фланкированный  $\alpha$ -спиралями, а 2-я и 3-я  $\beta$ -ленты формируют полость для каталитических остатков. Активные центры большинства эндонуклеаз рестрикции типа II подобны и характеризуются мотивом PD...(D/E)XK, из которого по крайней мере три аминокислотных остатка консервативны.

Рентгеноструктурные исследования показали, что эндонуклеазы рестрикции имеют два сайта связывания ионов металла, которые могут быть оба заняты ионами металла, только в одном из них локализуется ион или оба сайта не содержат иона металла [28]. Результаты, полученные при изучении зависимости расщепления ДНК от концентрации  $Mg^{2+}$  и  $Mn^{2+}$  и исследовании кристаллических структур комплексов фермент–субстрат и фермент–продукт, позволили авторам [28] предположить, что существует каталитический сайт, важный для осуществления катализа, и второй сайт, который является необязательным. Этот второй сайт может модулировать эффективность катализа в зависимости от того, занят ли он ионом  $Mg^{2+}$  ( $Mn^{2+}$ ) или  $Ca^{2+}$ . Был предложен механизм с участием одного иона металла для связывания и расщепления ДНК, второму иону металла отведена модуляторная роль. При высоких концентрациях этого иона активность может уменьшиться в случае  $Mg^{2+}$  ( $Mn^{2+}$ ) или увеличиться в случае  $Ca^{2+}$ .

Особым классом сайт-специфических эндонуклеаз являются хоминг-эндонуклеазы, отличительной чертой которых является способность узнавать протяженные нуклеотидные последовательности за счет образования большого числа специфических и неспецифических контактов с ДНК по всей длине сайта узнавания. Хоминг-эндонуклеазы по структурным мотивам разделяют на шесть семейств. Одно из этих семейств характеризуется каталитическим доменом с PD...(D/E)XK-мотивом, обычно существующим в эндонуклеазах рестрикции II типа [41].

Высокоспецифическая интронкодируемая металлзависимая хоминг-эндонуклеаза I-PpoI из *Physarum polycephalum* [43], принадлежащая семейству His-Cys-box эндонуклеаз, и неспецифические эндонуклеазы имеют, как выяснилось при их сравнении, одинаковое строение активного центра, который включает в себя две антипараллельные  $\beta$ -ленты и одну  $\alpha$ -спираль с локализованным между ними двухвалентным ионом металла, так называемый  $\beta\beta\alpha$ -металл-мотив. Этот

фрагмент включает в себя мотив Asp-Arg-Gly-His аминокислот, являющийся консервативным и наличие которого в активном центре присуще всем рассмотренным в данной работе неспецифическим эндонуклеазам, несмотря на иногда существенные различия пространственного строения белковых молекул. Подобная  $\beta\beta\alpha$ -металл-топология полости удлиненной формы в каталитическом ядре выявлена только в единственной специфической эндонуклеазе I-PpoI.

Среди членов семейства ДНК/РНК неспецифических эндонуклеаз внеклеточная нуклеаза *Sm* является одной из наиболее изученных бактериальных нуклеаз, проявляющих широкую субстратную специфичность. Шляпников с соавторами [85], используя данные о кристаллических структурах интронкодируемой специфической хоминг-эндонуклеазы I-PpoI из *Physarum polycephalum* в комплексах с ДНК и с продуктом расщепления ДНК [43] и исходя из выраженного соответствия геометрий активных центров и структур водно-магниевого кофактора эндонуклеаз *Sm* и I-PpoI, предположили, что ДНК вблизи расщепляемой связи может быть связана эндонуклеазой *Sm* сходным с нуклеазой I-PpoI образом и что возможна реализация ферментами схожего для обоих белков химического механизма гидролиза фосфодиэфирных связей. Остаток гистидина (His89 в *Sm*, His98 в I-PpoI) выступает в роли общего основания, забирая протон у молекулы воды растворителя и тем самым активируя ее для нуклеофильной атаки на атом фосфора, примыкающий к разрываемой связи, что сопровождается разрывом 3'-O-P-связи. Реакция осуществляется в соответствии с *in-line*-механизмом и сопровождается инверсией конфигурации у атома фосфора. Внутренняя координационная сфера гидратированного магниевого кластера (вместе с остатком Asn119) выполняет функцию стабилизации промежуточного состояния и участвует в протонировании 3'-оксианиона уходящей группы в качестве льюисовской кислоты. Типичный одномолекулярный каталитический механизм, подобный тому, что предложен для I-PpoI и эндонуклеазы *Sm*, реализуется и в других рассмотренных в работе неспецифических эндонуклеазах.

Процесс узнавания ДНК сайт-специфическими ДНК-узнающими ферментами и неспецифическими происходит по-разному. В неспецифических комплексах ДНК принимает каноническую неизогнутую В-ДНК-конформацию, в специфических она изгибается на  $\sim 36^\circ$ , кроме того, ДНК более скрывается в интерфейсе субъединиц по сравнению с неспецифическими комплексами [105]. Специфические ДНК-связывающие белки при связывании со своими специфическими сайтами могут взаимодействовать с основаниями ДНК и могут вызывать большие

конформационные изменения в ДНК. В результате происходит распознавание специфических черт ДНК и ее расщепление.

На примере результатов рентгеноструктурных исследований кристаллических структур комплексов специфической эндонуклеазы рестрикции HindIII [30] можно видеть, что аминокислотные остатки фермента формируют контакты с нуклеотидами как в большом, так и в малом желобке. Прямые взаимодействия HindIII с основаниями осуществляются только с частью специфической последовательности и главным образом в большом желобке. Через молекулы воды в большом желобке также образуются водородные связи между белком и основаниями специфической последовательности ДНК. Конформация связанной ДНК искажена, существенно отличается от идеальной структуры В-ДНК.

Рентгеноструктурные исследования кристаллической структуры мутантного (H80A) комплекса неспецифической эндонуклеазы *I*un с ДНК [75] показали, что эта нуклеаза образует связи с субстратом только в малом желобке ДНК, причем только фосфатный остов ДНК образует водородные связи с *I*un. Дуплекс изгибается в направлении большого желоба приблизительно на 20°. Этот факт авторы [75] считают структурной основой для понимания процесса связывания фермента с ДНК/РНК независимо от их нуклеотидной последовательности. Ими же высказано предположение, что неспецифическая эндонуклеаза *I*un может связывать в малом желобке умеренно изогнутую цепочку ДНК с тем, чтобы избежать близких контактов с парами оснований ДНК и из-за того, что для деформации цепочки ДНК требуются большие затраты энергии.

Большинство сайт-специфических ДНК-связывающих белков взаимодействует с высоким сродством не только в специфических сайтах связывания, но также с ощутимым сродством в неспецифических сайтах [47].

Неспецифические эндонуклеазы, гидролизующие ДНК без специфики к последовательности, иногда имеют некоторые предпочтения при взаимодействии с нуклеотидной последовательностью. Авторы [105] предложили объяснение, почему неспецифические эндонуклеазы с некоторым предпочтением расщепляют ДНК в зависимости от последовательности. Они утверждают, что для более эффективного расщепления фосфодиэфирной связи важен прежде всего искаженный остов ДНК, а не параметры стекинга пар оснований, т.е. неспецифические эндонуклеазы предпочитают разрывать связи в местах, где остов ДНК более легко деформируется ферментом. Таким образом, хотя сайт-специфические и неспецифические ферменты взаимодействуют с ДНК по-разному, они пользуются схожими стратегиями изменения конформации остова ДНК,

проводя различия между “предпочтительными” и “непредпочтительными” сайтами при расщеплении ДНК.

Чтобы удостовериться, что все гипотезы, высказанные в отношении специфических и неспецифических ДНК-связывающих белков, справедливы, вероятно, необходимо большее количество структурных исследований кристаллических структур комплексов фермент–ДНК.

Работа выполнена за счет средств базового бюджетного финансирования ИК РАН и при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ (контракт № 16.512.11.2235).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Юсупова Д.В. Нуклеодеполимеразная активность бактерий в связи с некоторыми особенностями их физиологии. Казань: Изд-во КГУ, 1978. 204 с.
2. Laskowski M. // The enzymes. New York: Academic Press, 1971. P. 123.
3. Rosenberg J.M., Boyer H.W., Greene P.J. Gene amplification and analysis: restriction endonuclease. North-Holland; Amsterdam: Elsevier, 1981. P. 131.
4. Панфилова З.И., Салганик Р.И. // Микробиология. 1983. Т. 52. P. 974.
5. Мальцева Б.М. // Ветеринария. Реферативный журнал. 1999. Т. 2. С. 532.
6. Детиненко Л.Д., Клименко В.П., Подгорный В.Ф. и др. Средство “Эндоглюкин” для профилактики и лечения вирусных заболеваний пчел и стимуляция развития пчелиных семей. 1995. Патент РФ № 2038776.
7. Куриненко Б.М., Беляева М.И., Черепнева И.Е. и др. // Вопросы онкологии. 1977. Т. 23. С. 94.
8. Филимонова М.Н., Балабан Н.П., Шарипова Ф.Р. и др. // Биохимия. 1980. Т. 45. С. 2095.
9. Geel T.M., Meiss G., van der Gun B.T. et al. // Exp. Cell Res. 2009. V. 315. P. 2487.
10. Pingoud A., Fuxreiter M., Pingoud V. et al. // Cell. Mol. Life Sci. 2005. V. 62. P. 685.
11. Roberts R.J., Belfort M., Bestor T. et al. // Nucleic Acids Res. 2003. V. 31. P. 1805.
12. Roberts R.J., Halford S.E. // Nucleases. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1993.
13. Smith H.O., Nathans D. // J. Mol. Biol. 1973. V. 81. P. 419.
14. Colleaux L., D'Auriol L., Galibert F. et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1988. V. 85. P. 6022.
15. Monteilhet C., Perrin A., Thierry A. et al. // Nucleic Acids Res. 1990. V. 18. P. 1407.
16. Muscarella D.E., Ellison E.L., Ruoff B.M. et al. // Mol. Cell. Biol. 1990. V. 10. P. 3386.
17. Quirk S.M., Bell-Pedersen D., Belfort M. // Cell. 1989. V. 56. P. 455.
18. Чмуж Е.В., Каширина Ю.Г., Томилова Ю.Э. и др. // Биотехнология. 2005. Т. 3. С. 22.
19. Чернухин В.А., Наякшина Т.Н., Абдурашитов М.А. и др. // Биотехнология. 2006. Т. 4. С. 31.

20. Roberts R.J., Vincze T., Posfai J. et al. // *Nucleic Acids Res.* 2003. V. 31. P. 418.
21. Halford S.E., Welsh A.J., Szczelkun M.D. // *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 2004. V. 33. P. 1.
22. Huai Q., Colandene J.D., Chen Y. et al. // *EMBO J.* 2000. V. 19. P. 3110.
23. Jo K., Topal M.D. // *Science.* 1995. V. 267. P. 1817.
24. Kirsanova O.V., Baskunov V.B., Gromova E.S. // *Mol. Biol. (Mosk).* 2004. V. 38. P. 886.
25. Mucke M., Kruger D.H., Reuter M. // *Nucleic Acids Res.* 2003. V. 31. P. 6079.
26. Oller A.R., Vanden Broek W., Conrad M. et al. // *Biochemistry.* 1991. V. 30. P. 2543.
27. Stahl F., Wende W., Jeltsch A. et al. // *Biol. Chem.* 1998. V. 379. P. 467.
28. Pingoud V., Wende W., Friedhoff P. et al. // *J. Mol. Biol.* 2009. V. 393. P. 140.
29. Tang D., Ando S., Takasaki Y. et al. // *Protein Eng.* 2000. V. 13. P. 283.
30. Watanabe N., Takasaki Y., Sato C. et al. // *Acta Cryst. D.* 2009. V. 65. P. 1326.
31. Kruger D.H., Barcak G.J., Reuter M. et al. // *Nucleic Acids Res.* 1988. V. 16. P. 3997.
32. Reuter M., Kupper D., Meisel A. et al. // *J. Biol. Chem.* 1998. V. 273. P. 8294.
33. Mucke M., Lurz R., Mackeldanz P. et al. // *J. Biol. Chem.* 2000. V. 275. P. 30631.
34. Vanamee E.S., Viadiu H., Kucera R. et al. // *EMBO J.* 2005. V. 24. P. 4198.
35. Williams S.A., Halford S.E. // *Nucleic Acids Res.* 2001. V. 29. P. 1476.
36. Duan X., Gimble F.S., Quioco F.A. // *Cell.* 1997. V. 89. P. 555.
37. Heath P.J., Stephens K.M., Monnat R.J., Jr. et al. // *Nat. Struct. Biol.* 1997. V. 4. P. 468.
38. Van Roey P., Meehan L., Kowalski J.C. et al. // *Nat. Struct. Biol.* 2002. V. 9. P. 806.
39. Van Roey P., Waddling C.A., Fox K.M. et al. // *EMBO J.* 2001. V. 20. P. 3631.
40. Shen B.W., Landthaler M., Shub D.A. et al. // *J. Mol. Biol.* 2004. V. 342. P. 43.
41. Zhao L., Bonocora R.P., Shub D.A. et al. // *EMBO J.* 2007. V. 26. P. 2432.
42. Dassa B., London N., Stoddard B.L. et al. // *Nucleic Acids Res.* 2009. V. 37. P. 2560.
43. Flick K.E., Jurica M.S., Monnat R.J., Jr. et al. // *Nature.* 1998. V. 394. P. 96.
44. Meiss G., Gast F.U., Pingoud A.M. // *J. Mol. Biol.* 1999. V. 288. P. 377.
45. Muscarella D.E., Vogt V.M. // *Cell.* 1989. V. 56. P. 443.
46. Belfort M., Roberts R.J. // *Nucleic Acids Res.* 1997. V. 25. P. 3379.
47. Pingoud A., Jeltsch A. // *Eur. J. Biochem.* 1997. V. 246. P. 1.
48. Xu Q.S., Kucera R.B., Roberts R.J. et al. // *Structure.* 2004. V. 12. P. 1741.
49. Yang Z., Horton J.R., Maunus R. et al. // *Nucleic Acids Res.* 2005. V. 33. P. 1892.
50. Newman M., Strzelecka T., Dorner L.F. et al. // *Nature.* 1994. V. 368. P. 660.
51. Newman M., Strzelecka T., Dorner L.F. et al. // *Science.* 1995. V. 269. P. 656.
52. Townson S.A., Samuelson J.C., Vanamee E.S. et al. // *J. Mol. Biol.* 2004. V. 338. P. 725.
53. Newman M., Lunnen K., Wilson G. et al. // *EMBO J.* 1998. V. 17. P. 5466.
54. Viadiu H., Aggarwal A.K. // *Nat. Struct. Biol.* 1998. V. 5. P. 910.
55. Deibert M., Grazulis S., Sasnauskas G. et al. // *Nat. Struct. Biol.* 2000. V. 7. P. 792.
56. Yonemura K., Matsumoto K., Maeda H. // *J. Biochem.* 1983. V. 93. P. 1287.
57. Ball T.K., Saurugger P.N., Benedik M.J. // *Gene.* 1987. V. 57. P. 183.
58. Biedermann K., Jepsen P.K., Riise E. et al. // *Carlsberg Res. Commun.* 1989. V. 54. P. 17.
59. Friedhoff P., Franke I., Krause K.L. et al. // *FEBS Lett.* 1999. V. 443. P. 209.
60. Friedhoff P., Kolmes B., Gimadutdinow O. et al. // *Nucleic Acids Res.* 1996. V. 24. P. 2632.
61. Friedhoff P., Meiss G., Kolmes B. et al. // *Eur. J. Biochem.* 1996. V. 241. P. 572.
62. Miller M.D., Krause K.L. // *Protein Sci.* 1996. V. 5. P. 24.
63. Nestle M., Roberts W.K. // *J. Biol. Chem.* 1969. V. 244. P. 5213.
64. Nestle M., Roberts W.K. // *J. Biol. Chem.* 1969. V. 244. P. 5219.
65. Шляпников С.В., Благова Е.В., Левдикова В.М. и др. // *Молекулярная биология.* 1999. Т. 33. С. 454.
66. Lacks S., Greenberg B., Neuberger M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1974. V. 71. P. 2305.
67. Lacks S., Greenberg B., Neuberger M. // *J. Bacteriol.* 1975. V. 123. P. 222.
68. Muro-Pastor A.M., Flores E., Herrero A. et al. // *Mol. Microbiol.* 1992. V. 6. P. 3021.
69. Lunin V.Y., Levnikov V.M., Shlyapnikov S.V. et al. // *FEBS Lett.* 1997. V. 412. P. 217.
70. Miller M.D., Cai J., Krause K.L. // *J. Mol. Biol.* 1999. V. 288. P. 975.
71. Miller M.D., Tanner J., Alpaugh M. et al. // *Nat. Struct. Biol.* 1994. V. 1. P. 461.
72. Kolmes B., Franke I., Friedhoff P. et al. // *FEBS Lett.* 1996. V. 397. P. 343.
73. Lunin V., Blagova E.V., Levnikov V.M. et al. // *Mol. Biol. (Mosk).* 1999. V. 33. P. 214.
74. Wu S.I., Lo S.K., Shao C.P. et al. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2001. V. 67. P. 82.
75. Li C.L., Hor L.I., Chang Z.F. et al. // *EMBO J.* 2003. V. 22. P. 4014.
76. Altermark B., Helland R., Moe E. et al. // *Acta Cryst. D.* 2008. V. 64. P. 368.
77. Meiss G., Franke I., Gimadutdinow O. et al. // *Eur. J. Biochem.* 1998. V. 251. P. 924.
78. Baliaeva M.I., Kapranova M.N., Vitol M.I. et al. // *Mikrobiologiya.* 1976. V. 45. P. 420.

79. Franke I., Meiss G., Blecher D. et al. // FEBS Lett. 1998. V. 425. P. 517.
80. Meiss G., Gimadutdinov O., Haberland B. et al. // J. Mol. Biol. 2000. V. 297. P. 521.
81. Шляпников С.В., Лунин В.В., Благова Е.В. и др. // Журн. неорган. химии. 2001. Т. 46. С. 1858.
82. Ghosh M., Meiss G., Pingoud A. et al. // J. Biol. Chem. 2005. V. 280. P. 27990.
83. Loll B., Gebhardt M., Wahle E. et al. // Nucleic Acids Res. 2009. V. 37. P. 7312.
84. Moon A.F., Midon M., Meiss G. et al. // Nucleic Acids Res. 2011. V. 39. P. 2943.
85. Shlyapnikov S.V., Lunin V.V., Perbandt M. et al. // Acta Cryst. D. 2000. V. 56. P. 567.
86. Filimonova M., Gubskaya V., Nuretdinov I. et al. // Biometals. 2003. V. 16. P. 447.
87. Filimonova M.N., Gubskaya V.P., Nuretdinov I.A. et al. // Biochemistry (Mosc). 1997. V. 62. P. 983.
88. Романова Ю.Д. // "Механизмы регуляции активности эндонуклеазы бактерий *Serratia marcescens*", Дис. ... канд. биол. наук. Казань, КГУ, 2009.
89. Ball T.K., Suh Y., Benedik M.J. // Nucleic Acids Res. 1992. V. 20. P. 4971.
90. Muro-Pastor A.M., Herrero A., Flores E. // J. Mol. Biol. 1997. V. 268. P. 589.
91. Dupureur C.M. // Curr. Opin Chem. Biol. 2008. V. 12. P. 250.
92. Galburt E.A., Stoddard B.L. // Biochemistry. 2002. V. 41. P. 13851.
93. Pingoud A., Jeltsch A. // Nucleic Acids Res. 2001. V. 29. P. 3705.
94. Beese L.S., Derbyshire V., Steitz T.A. // Science. 1993. V. 260. P. 352.
95. Beese L.S., Friedman J.M., Steitz T.A. // Biochemistry. 1993. V. 32. P. 14095.
96. Connolly B.A., Eckstein F., Pingoud A. // J. Biol. Chem. 1984. V. 259. P. 10760.
97. Grasby J.A., Connolly B.A. // Biochemistry. 1992. V. 31. P. 7855.
98. Jeltsch A., Alves J., Maass G. et al. // FEBS Lett. 1992. V. 304. P. 4.
99. Koval R.A., Matthews B.W. // Curr Opin Chem Biol. 1999. V. 3. P. 578.
100. Galburt E.A., Chadsey M.S., Jurica M.S. et al. // J. Mol. Biol. 2000. V. 300. P. 877.
101. Luscombe N.M., Thornton J.M. // J. Mol. Biol. 2002. V. 320. P. 991.
102. Drew H.R., Travers A.A. // Cell. 1984. V. 37. P. 491.
103. Hogan M.E., Austin R.H. // Nature. 1987. V. 329. P. 263.
104. Meiss G., Friedhoff P., Hahn M. et al. // Biochemistry. 1995. V. 34. P. 11979.
105. Wang Y.T., Yang W.J., Li C.L. et al. // Nucleic Acids Res. 2007. V. 35. P. 584.