

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

(ОТДЕЛЬНЫЙ ОТТИСК)

МОСКВА

ФИЗИКА И ФИЗИЧЕСКАЯ ХИМИЯ БИОПОЛИМЕРОВ

УДК 577.152.314:57.012.7

ВНЕКЛЕТОЧНАЯ ЭНДОНУКЛЕАЗА *Serratia marcescens*.

I. ПРОСТРАНСТВЕННАЯ СТРУКТУРА БЕЛКА В КРИСТАЛЛИЧЕСКОМ СОСТОЯНИИ ПРИ РАЗРЕШЕНИИ 1.7 Å

© 1999 г. В. Ю. Лунин, Е. В. Благова¹, В. М. Левдиков¹, В. В. Лунин¹,
С. В. Шляпников², М. Пербандт³, К. С. Райшанкар³, Х. Бетзель³, А. М. Михайлов¹

Институт математических проблем биологии Российской академии наук,
Пущино, Московская область, 142292

¹ Институт кристаллографии им. А.В. Шубникова Российской академии наук, Москва, 117333

² Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, 117984

³ Институт физиологической химии Гамбургского университета, Гамбург, Германия, 22603

Поступила в редакцию 16.02.98 г.

Проведено рентгеноструктурное уточнение пространственной структуры нуклеазы *Serratia marcescens* в кристаллическом состоянии при разрешении 1.7 Å. Локализованы 3678 неводородных атомов фермента и 443 связанных с белком молекул воды. Достоверность полученного решения характеризуется значениями факторов $R = 17.3\%$ и $\bar{R}_{free} = 22.2\%$. Средние величины отклонений длин связей и валентных углов от стандартных значений в уточненной модели равны 0.011 Å и 1.8°, а максимальные не превышают 0.07 Å и 11° соответственно. Предложена новая топологическая схема хода полипептидной цепи, выявлена выраженная симметрия структуры мономерной глобулы белка в его N- и C-концевых участках.

Ключевые слова: *Serratia marcescens*, внеклеточная эндонуклеаза, рентгеноструктурный анализ, атомная структура.

Внеклеточная эндонуклеаза *Serratia marcescens* (нуклеаза Sm [К.Ф. 3.1.4.9]) принадлежит к семейству неспецифических к химической природе углеводного компонента нукleinовых кислот структурно родственных нуклеодеполимераз, которые катализируют расщепление 3'О-Р-фосфодиэфирных связей одно- и двухцепочных молекул ДНК и РНК с образованием в качестве продуктов реакции 5'-фосфорилированных олигонуклеотидов [1–5].

В настоящее время известно наличие, по крайней мере, трех изоформ (*Sm 1*, *Sm 2* и *Sm 3*) нуклеазы с несколько различающимися N-концевыми структурами, которые возникают, по-видимому, в результате ферментативной деградации нативной “зрелой” молекулы под действием протеиназ в перiplазматическом пространстве или в процессе транспорта через цитоплазматическую мембрну [6, 7]. Единственным различием между исходной нуклеазой (*Sm 2*) и двумя ее изоформами (*Sm 1* и *Sm 3*) является гетерогенность их N-концевых последовательностей – последние две формы, по сравнению с нуклеазой *Sm 2*, теряют три и один аминокислотный остаток соответственно.

Исследование пространственного строения молекулы нуклеазы *Sm* в кристаллическом состо-

янии практически одновременно начаты нами [8, 9] и группой сотрудников в Хьюстонском университете [10]. Позднее в работе Миллера с коллегами [11] с использованием метода изоморфного замещения проведено определение и уточнение структуры нуклеазы *Sm* при разрешении 2.1 Å [29466 рефлексов], согласно которой молекула белка в первом приближении может быть композиционно описана тремя областями структуры – центральным β-слоем, составленным шестью антипараллельными β-цепями, к которому с одной стороны примыкает α/β-домен, содержащий три короткие α-спирали и β-лист из двух антипараллельных β-стрэндов, а с другой – конформационный домен, формируемый длинными петлями нерегулярных структур и одной протяженной α-спиралью.

В настоящей части работы описаны результаты кристаллографического уточнения структуры нуклеазы *Sm* при разрешении 1.7 Å (57000 рефлексов), что позволило получить более точную и надежную информацию о пространственном строении фермента. Предложена новая топологическая схема полипептидной цепи молекулы белка, при этом выделены новые элементы вторичной структуры и показана значительная симметрия при укладке элементов вторичной структуры в глобулу.

Принятые сокращения: нуклеаза *Sm* – внеклеточная эндонуклеаза *Serratia marcescens* [К.Ф. 3.1.4.9].

Эл. почта: amm@biostr.crystal.msk.ru

Таблица 1. Рентгенодифракционные параметры кристаллов нуклеазы *Sm*

Число кристаллов	1
Пространственная группа	P2 ₁ 2 ₁ 2
Параметры элементарной ячейки, Å:	
<i>a</i>	106.7
<i>b</i>	74.8
<i>c</i>	69.0
Число молекул в независимой части ячейки	2
Разрешение, Å	30.3–1.7
Число измеренных отражений (<i>I</i> > σ)	219270
Число независимых отражений (<i>I</i> > σ)	57095
Полнота набора, %	94.6
<i>R</i> _{merge} , %	7.0
<i>R</i> _{st} , %	5.3

Примечание. $R_{\text{merge}} = \sum |I - \langle I \rangle| / \sum \langle I \rangle$, $R_{\text{st}} = \sum \sigma / \sum I$, где *I* – измеренное индивидуальное значение интенсивности отражения, $\langle I \rangle$ – среднее значение интенсивности по симметрично связанным отражениям.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Нуклеаза *Sm*. В работе использовали изоформу *Sm* 1 нуклеазы, которая сравнительно с исходной нативной молекулой фермента (*Sm* 2) не содержала первых трех аминокислотных остатков (Asp-Thr-Leu) [6, 7], однако нумерацию остатков в первичной структуре исследуемого белка принимали соответствующей таковой для *Sm* 2 формы, т.е. N-концевой остаток нуклеазы *Sm* 1 (Glu) обозначали как Glu-4 и так далее. Предварительную очистку белка из коммерческого препарата нуклеазы марки М (НПО “Вектор”, Новосибирск) проводили по ранее описанной методике [6, 9].

Кристаллизация и получение рентгенодифракционных данных высокого разрешения. Выращивание кристаллов, пригодных для проведения рентгеноструктурного анализа при высоком разрешении, проводили методом диффузии паров растворителя в варианте “висячей капли”. Исходный кристаллизационный раствор содержал 10–12 мг/мл белка, 0.6 М сульфат аммония в 10 mM Трис-HCl-буфере с pH 8.3 в присутствии 5 mM MgSO₄. Для рентгенодифракционных исследований использовали призматические кристаллы размером 0.7 × 0.3 × 0.2 мм.

Набор интенсивностей рентгеновских отражений от кристаллов белка в нативном состоянии до разрешения 1.7 Å собран на синхротронном излучении станции X11 на накопительном кольце DORIS (EMBL, c/o DESY, Гамбург, Германия) с использованием детектора “Imaging Plate”, разработанного Д. Хендриксом и А. Лентфером. Инте-

Таблица 2. Полнота набора дифракционных данных

Разрешение, Å	Число независимых рефлексов	Число измеренных рефлексов	Полнота набора, %
30.3–7.18	883	474	53.7
7.18–5.24	1355	1186	87.5
5.24–4.33	1686	1432	84.9
4.33–3.77	1957	1723	88.0
3.77–3.38	2200	2038	92.6
3.38–3.10	2411	2307	95.7
3.10–2.87	2596	2506	96.5
2.87–2.69	2784	2684	96.4
2.69–2.54	2945	2855	96.9
2.54–2.41	3110	3016	97.0
2.41–2.30	3260	3182	97.6
2.30–2.20	3400	3312	97.4
2.20–2.12	3540	3436	97.1
2.12–2.04	3664	3557	97.1
2.04–1.97	3788	3678	97.1
1.97–1.91	3935	3814	96.9
1.91–1.85	4041	3900	96.5
1.85–1.80	4163	4018	96.5
1.80–1.75	4252	4100	96.4
1.75–1.70	4392	3877	88.3

грирование было проведено программой DENZO (З. Отвиновски).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Уточнение структуры нуклеазы *Sm*. Рентгенографические характеристики кристаллов нуклеазы *Sm* и набора экспериментальных дифракционных данных приведены в табл. 1, 2.

В качестве стартовой модели для уточнения была взята депонированная в Protein Data Bank модель молекулы, уточненная ранее [11] при разрешении 2.1 Å (29466 отражений с *F*/ σ > 2 в зоне от 6 до 2.04 Å) до *R*-фактора 16.8%. При этом в модели помимо 3694 неводородных атомов двух молекул белка, связанных некристаллографической симметрией, присутствовало 224 молекул воды. Стандартный кристаллографический *R*-фактор, рассчитанный для имеющихся экспериментальных данных (55952 отражений с *F*/ σ > 2 в зоне от 6 до 1.7 Å), составил 32.4%. Поскольку молекулы воды, как правило, являются менее надежно определяемой частью структуры, и параметры элементарных ячеек использовавшихся нами (см. табл. 1) и группой Краузе (106.7 × 74.5 × 68.9 Å) [11] кристаллов несколько отличались, что отчасти могло свидетельствовать и о наличии разни-

Таблица 3. Статистические параметры хода уточнения структуры нуклеазы Sm при разрешении 1.7 Å

Разрешение, Å	6.0–1.7
Число рабочих отражений (использованных при уточнении)	50268
Число контрольных отражений (не использовавшихся при уточнении)	5679
Число остатков в модели	2 × 239
Число неводородных атомов в модели	3678
Число молекул воды, включенных в модель	443
Стандартный R-фактор, %	17.3
Свободный R-фактор, %	22.2
Среднеквадратичные/максимальные отклонения от стандартных значений для:	
длин связей, Å	0.011/0.069
валентных углов, °	1.8/10.9
Средние/максимальные значения β-факторов (остатки 7–243):	
атомы главной цепи, Å ²	12.9/31.4
атомы боковых цепей, Å ²	16.0/50.5
молекулы воды, Å ²	35.1/62.9
Среднее значение В-фактора для концевых остатков 5–6 и 244–245:	
атомы главной цепи, Å ²	39.1
атомы боковых цепей, Å ²	43.8
Статистика распределения двугранных углов остатков на карте Рамачандрана, %	
в разрешенных областях	91.2
в дополнительных областях	7.8

цы в структуре водного окружения молекул, то все молекулы воды были исключены из стартовой модели и реконструированы на более поздних стадиях исследования независимо. Исключение воды несущественно сказалось на стартовом значении R-фактора, которое составило в этом случае величину 36.0%.

В ходе уточнения для обеспечения более надежного контроля из экспериментальных данных в самом начале работы были отобраны случайным образом 10% отражений, которые образовали контрольный набор, использующийся далее для расчета свободного R-фактора [12]. Следует подчеркнуть, что далее на всем протяжении работы этот набор не изменялся, и экспериментальные значения модулей структурных факторов из этого набора не использовали ни для уточнения атомной модели, ни для построения синтезов Фурье, по которым далее производилась ручная правка модели, либо добавление молекул воды.

С целью понижения уровня шума на синтезах Фурье, вызванного исключением из расчета синтеза отражений контрольного набора, для таких отражений в расчете синтезов использовали рассчитанные по модели модули структурных факторов. Снижение уровня шума, вызванного ошибками в используемых фазах структурных факторов, достигали введением в расчет синтезов весовых

множителей, определенных на базе максимизации маргинальной функции правдоподобия, вычисляемой по контрольному набору отражений [13, 14].

На первом этапе уточнение проводили на IBM PC 486 с помощью программы FROG [15, 16], позволяющей легко осуществлять произвольную разбивку модели на блоки, рассматриваемые как жесткие тела. Уточнение проводили с постепенным расширением набора используемых отражений и постепенным увеличением числа степеней свободы модели. Сначала для обеих молекул, присутствующих в элементарной части ячейки, набор экспериментальных данных был ограничен разрешением 3.0 Å. После чего модель была разбита на две жесткие группы: группы, состоящие из атомов главной цепи каждой из молекул, и группы, отвечающие каждой из боковых цепей. Уточнение велось при разрешении 2.1 Å. Далее разрешение было повышенено до 1.9 Å, а количество степеней свободы было увеличено за счет того, что как независимая жесткая группа рассматривались теперь каждое пептидное звено и каждая боковая цепь. Наконец, на заключительной стадии все атомы модели уточнялись независимо, и разрешение было доведено до 1.7 Å. На всех этапах уточнения осуществлялся контроль за всеми стереохимическими параметрами (длины ва-

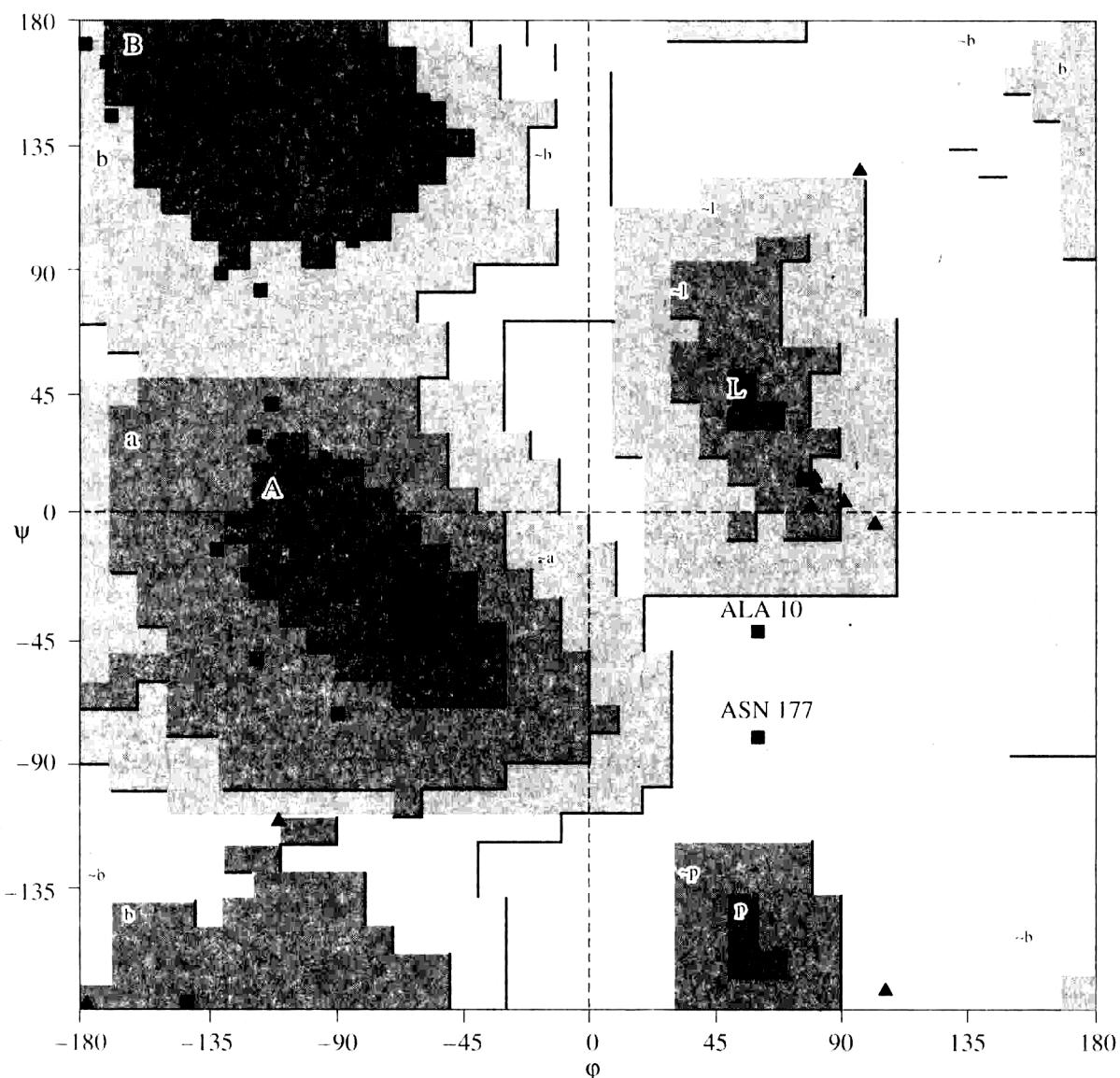


Рис. 1. Карта Рамачандрана для уточненной структуры молекулы нуклеазы *Sm*.

лентных связей, величины валентных углов, планарность заданных групп атомов, невалентные взаимодействия), не фиксированными внутри жестких групп. В результате такого уточнения была получена модель со значениями кристаллографических факторов $R = 24.1\%$ и $R_{free} = 29.2\%$, при этом среднее отклонение длин связей и валентных углов от стандартных значений составляло 0.004 \AA и 1.06° соответственно.

Далее в модель было добавлено 358 молекул воды, включение которых проводилось в автоматическом режиме в два этапа. На первом этапе на разностном синтезе Фурье были выбраны наиболее сильные пики, образовавшие список возможных мест посадки воды (около 2000 пиков). На втором этапе были проанализированы атомные окружения каждого из пиков и отобраны лишь те

пики, для которых на приемлемом расстоянии находились атомы, способные образовывать с молекулами воды водородные связи. Отбор мест проводили при помощи программы ASIR [17].

Дальнейшее уточнение модели проводили с помощью программного комплекса X-PLOR [18]. При этом этапы автоматического уточнения чередовали с анализом и интерактивной правкой модели на графических станциях при помощи программ FRODO [19] и O [20]. На последних этапах уточнения в модель были включены по описанной выше методике дополнительные молекулы воды так, что общее их число составило 439, при этом индивидуальные значения их уточненных B -факторов не превышали 63 \AA^2 . Результатирующие значения факторов достоверности по зоне разрешения $6.0\text{--}1.7 \text{ \AA}$ составили: $R = 17.3\%$ и

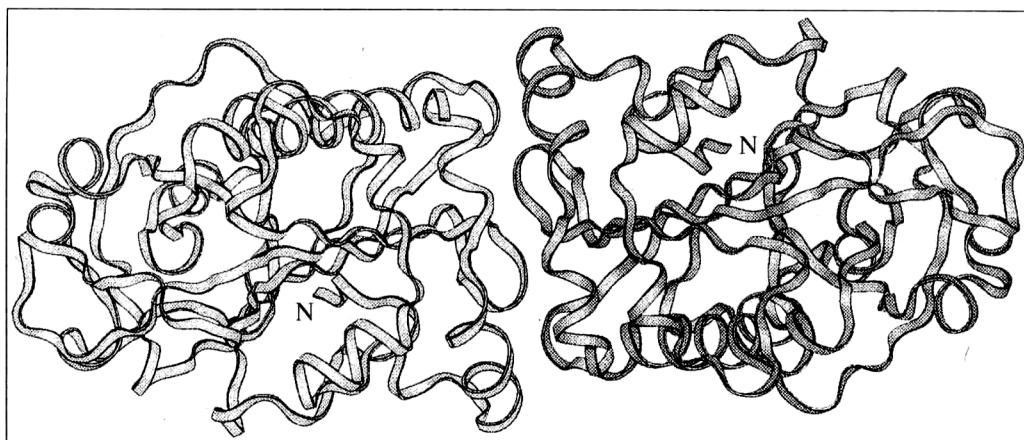


Рис. 2. Структура димера нуклеазы *Sm* по результатам уточнения при разрешении 1.7 Å.

$R_{free} = 22.2\%$. Средние величины отклонений длин связей и валентных углов в уточненной модели от стандартных значений составили 0.011 Å и 1.8°, а максимальные не превышали 0.07 Å и 11° соответственно. Проверка качества модели при помощи программы PROCHECK [21] показала, что по всем контролируемым параметрам модель находится либо внутри интервала обычно встречающихся значений, либо превосходит их по качеству. Некоторые характеристики уточненной структуры отражены в табл. 3.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Согласно карте Рамачандрана (рис. 1), рассчитанной для финальной модели нуклеазы *Sm* по программе PROCHECK, значения торсионных углов ϕ и ψ для аминокислотных остатков основной цепи белка попадают в область разрешенных значений и все неглициновые остатки, за исключением Ala-10 и Asn-117, находятся в наиболее выгодных либо в допустимых конформациях. Модель отвечает всем стереохимическим требованиям, предъявляемым к структурам высокого разрешения. Остатки Ala-10 и Asn-177 находятся при этом в конформации γ -поворота [22, 23], который в последнее время также рассматривается как допустимая конформация [24]. При этом следует отметить, что остаток Ala-10 содержится в короткой петле Cys-9-Ala-10-Val-11-Gly-12-Cys-13, стабилизированной S-S мостиком между остатками цистеина и водородными связями Cys-9 O-Val-11 N, Val-11 O-Gly-221 N и Gly-12 O-Ala-220 N, а остатки аспарагина, согласно статистическому анализу [25], проявляют тенденцию более часто попадать в правую часть карты Рамачандрана, нежели другие типы аминокислотных остатков.

Сравнение полученной (рис. 2) и стартовой модели [11] структур нуклеазы *Sm* подтверждает высокое качество исходной модели и показывает

отсутствие принципиальных расхождений в этих моделях. Среднеквадратичное отклонение в координатах их атомов составило 0.16 Å для атомов главной цепи и 0.36 Å для всех неводородных атомов. При этом максимальные отклонения (до 0.75 Å по атомам главной цепи и до 6.3 Å по атомам боковых групп) достигались в наружных петлях, экспонированных в растворитель, и сопровождались относительно высокими значениями температурных факторов. Примерно такие же различия были обнаружены и при сравнении двух независимо уточнявшихся молекул, находящихся в независимой части ячейки и связанных некристаллографической симметрией — среднеквадратичное и максимальное отклонение в координатах атомов молекул, связанных некристаллографической симметрией, составили соответственно 0.12 Å и 0.68 Å для атомов главной цепи и 0.62 Å и 5.08 Å для атомов боковых групп.

Анализ уточненной при разрешении 1.7 Å модели дает возможность предложить иную, чем ранее [11], топологическую схему хода полипептидной цепи в молекуле нуклеазы (рис. 3) позволяющую более явно выделить значительную симметрию отдельных локусов глобулы.

Предлагаемые изменения касаются, в основном, двух областей структуры белка: сегмента цепи Asp-49-Arg-136, образующего верхний слой молекулы, участвующего в связывании субстрата и содержащего активный центр фермента [11], и C-концевого сегмента цепи Ala-198-Gly-242, вовлеченного в процесс структурной димеризации белка [26]. В предложенной ранее интерпретации полипептидная цепь Asp-49-Arg-136 рассматривалась как “длинная неупорядоченная петля Thr-50-Gln-114, переходящая в длинную искривленную спираль Lys-115-Asp-135” [11]. Однако, согласно настоящим данным, визуальный анализ пространственного строения молекулы (рис. 2), анализ распределения значений двугранных углов ϕ и ψ

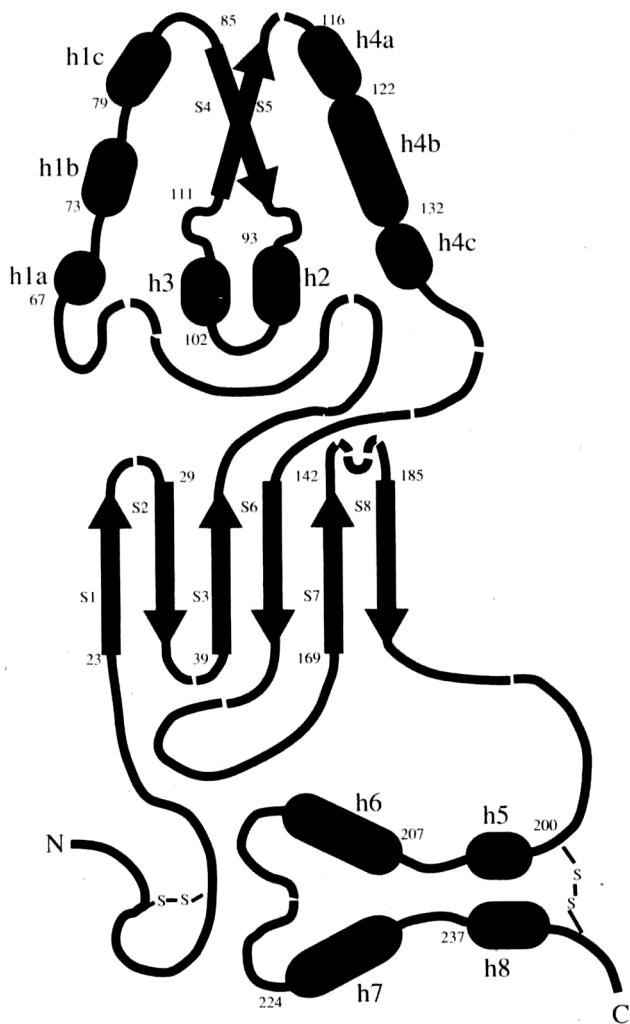


Рис. 3. Топологическая схема полипептидной цепи нуклеазы *Sm* при разрешении 1.7 Å.

(рис. 1) и система водородных связей (табл. 4) показывают, что этот участок имеет достаточно жесткую конформацию и позволяет выявить наличие значительного количества дополнительных элементов вторичной структуры (рис. 4а).

Центральная часть верхнего слоя молекулы состоит из скрученного на 180° двухстрэндового β-листа s4 (Val-85-His-89) и s5 (Ile-111-Lys-115), обрамленного симметричной системой спиральных участков. При этом три коротких спиральных участка h1a (Pro-67-Asp-69, спираль α_{10}), h1b (Pro-73-Tyr-76, спираль α_{10}) и h1c (Ala-79-Leu-83, α -спираль), предшествующие β-листу, напоминают по пространственному расположению спиральный участок Ser-116-Asp-135, состоящий, в свою очередь, из трех вплотную примыкающих друг к другу спиралей h4a (Ser-116-Gln-120), h4b (Ala-122-Arg-131) и h4c (Lys-132-Asp-135), находящихся под небольшим углом друг к другу. Спираль h4a является промежуточной между спира-

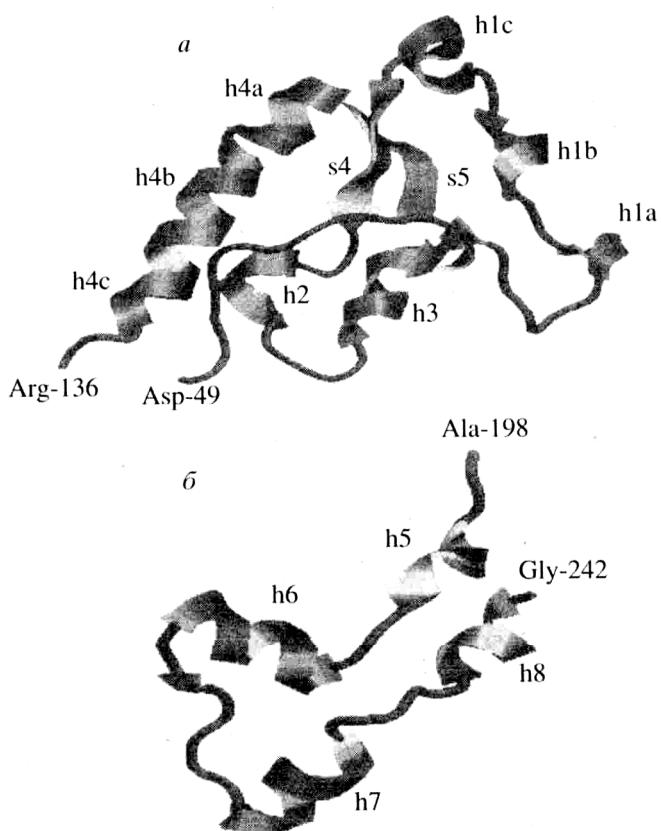


Рис. 4. Пространственное расположение элементов вторичной структуры N- (а) и C- (б) концевых участков молекулы нуклеазы *Sm*.

лью α_{10} и α -спиралью, h4b представляет собой почти идеальную α -спираль, а концевой участок h4c ближе к α_{10} спирали. Концы β-стрэндов His-89 и Ile-111 соединены шпилькой, образованной двумя короткими α_{10} -спиральями h2 (Leu-93-Leu-96) и h3 (Trp-102-Asn-106). Участок петли Thr-50-Lys-60 находится в конформации, близкой к вытянутой, и сшит на концах водородными связями со спиралью h2 и h3. Следует отметить, что весь участок цепи Pro-73-Asp-135 расположен практически в одной плоскости, а участок Thr-50-Lys-60 образует дугу, расположенную перпендикулярно этой плоскости. Можно предположить, что, обладая за счет отсутствия стабилизирующих водородных связей большей конформационной свободой, участок Thr-50-Lys-60 может претерпевать изменения в процессе связывания ферментом ионов магния и субстрата.

Выделение дополнительной (отсутствующей в предыдущей схеме [11]) короткой спирали h5 (Phe-200-Arg-204) в C-концевом фрагменте полипептидной цепи Ala-198-Gly-242 позволяет более четко выявить симметрию, присущую этому участку молекулы (рис. 4б). Симметрия дополнительно подчеркивается тем, что более длинные

Таблица 4. Водородные связи в фрагментах Asp-49-Arg-136 и Asp-199-Gly-242 главной цепи нуклеазы *Sm*

Атомы главной цепи		Расстояние, Å	Атомы главной цепи		Расстояние, Å
Стабилизация концов петли					Спираль h4b
Thr-50 O	Gly-98 N	2.8	Gly-121 O	Arg-125 N	3.0
Ala-52 N	Ala-94 O	3.0	Ala-122 O	Leu-126 N	3.0
Lys-60 N	Asn-106 O	3.3	Trp-123 O	Glu-127 N	3.0
Lys-60 O	Leu-108 N	3.0	Ala-124 O	Asp-128 N	3.0
Спираль h1a					Arg-125 O
Asn-66 O	Asp-69 N	2.9	Leu-126 O	Glu-130 N	2.9
Pro-67 O	Thr-70 N	3.6	Glu-127 O	Arg-131 N	3.1
Спираль h1b					Asp-128 O
Ala-72 O	Asp-75 N	2.9	Спираль h4c		
Pro-73 O	Tyr-76 N	3.2	Glu-130 O	Leu-133 N	3.2
Ala-74 O	Thr-77 N	3.2	Arg-131 O	Ile-134 N	3.4
Спираль h1c					Lys-132 O
Gly-78 O	Ala-82 N	3.1	Спираль h5		
Ala-79 O	Leu-83 N	2.9	Asp-199 O	Gln-202 N	3.2
Asn-80 O	Lys-84 N	2.8	Phe-200 O	Phe-203 N	3.0
β-слой s4-s5					Cys-201 O
Lys-84 O	Ser-116 N	2.9	Спираль h6		
Asp-86 N	Gln-114 O	2.8	Thr-206 O	Ile-210 N	3.5
Asp-86 O	Gln-114 N	3.0	Val-207 O	Glu-211 N	3.0
Gly-88 N	Thr-112 O	3.0	Asp-208 O	Lys-212 N	2.9
Gly-88 O	Thr-112 N	3.1	Glu-209 O	Arg-213 N	3.1
Gln-90 N	Asn-112 O	2.9	Ile-210 O	Thr-214 N	3.0
Спираль h2					Glu-211 O
Leu-93 O	Leu-96 N	3.2	Спираль h7		
Leu-96 O	Val-99 N	3.1	Pro-223 O	Gln-227 N	3.1
Спираль h3					Asp-224 O
Asp-101 O	Ser-104 N	3.1	Asp-225 O	Ala-228 M	2.9
Trp-102 O	Leu-105 N	2.9	Val-226 O	Ser-229 N	3.1
Glu-103 O	Asn-106 N	3.0	Gln-227 O	Leu-230 N	2.9
Ser-104 O	Tyr-107 N	3.1	Спираль h8		
Спираль h4a					Val-236 O
Lys-115 O	Leu-118 N	3.0	Leu-237 O	Glu-239 N	3.1
Lys-115 O	Asn-119 N	3.0	Pro-238 O	Leu-240 N	2.9
Ser-116 O	Asn-119 N	3.2	Glu-239 O	Met-241 N	2.9
Ser-116 O	Gln-120 N	2.9	Спираль h8		
Asp-117 O	Gln-121 N	3.3	Leu-237 O	Gly-242 N	3.6
Leu-118 O	Gln-121 N	3.2	Pro-238 O	Met-241 N	2.9
Leu-118 O	Trp-123 N	3.2	Glu-239 O	Gly-242 N	3.6

спиральные участки h6 (Val-207-Thr-214) и h7 (Asp-224-Leu-230) находятся в α -спиральной конформации, а менее упорядоченные короткие участки h5 и h8 (Leu-237-Met-241) ближе к конфор-

мации спирали 3₁₀. Выраженная структурная симметрия, наблюдаемая в этом и рассмотренном ранее фрагментах цепи нуклеазы, может быть в качестве одной из гипотез результатом дуплика-

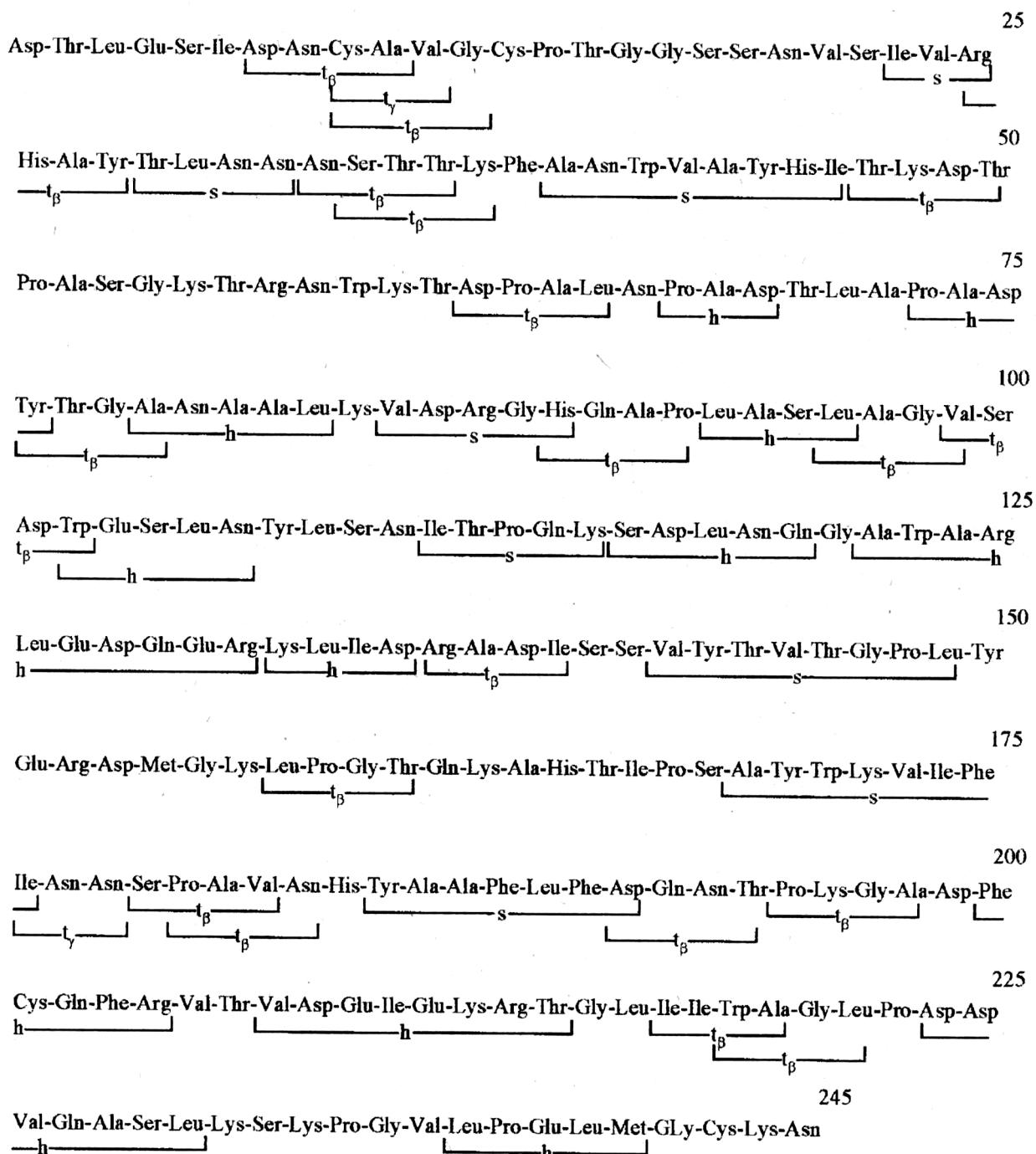


Рис. 5. Аминокислотная последовательность нуклеазы *Sm* и распределение элементов вторичной структуры – спиральные конформации (*h*), β -структурь (*s*), конформации β - и γ -поворотов (t_β и t_γ), по данным кристаллографического уточнения при 1.7 Å.

ции с инверсией соответствующих участков структурных генов ДНК в процессе эволюции.

Дополнительными элементами упорядоченной структуры нуклеазы *Sm* являются выявленные по данным рентгенографического анализа при разрешении 1.7 Å конформации β - и γ -пово-

ротов, в которых полипептидная цепь белка претерпевает изгиб на 180° (рис. 5).

В заключение следует отметить, что *Sm* нуклеаза является вторым после стафилококковой нуклеазы сахар-независимым ферментом с установленной пространственной структурой при высоком

разрешении. Вместе с тем, учитывая различие нуклеаз в специфичности гидролиза фосфодиэфирных связей нуклеиновых кислот (стафилококковая нуклеаза расщепляет 5'-O-P-связи), отсутствие их структурного сходства, наконец, взаимоисключающие требования к ионам двухвалентных металлов (стафилококковая нуклеаза активируется ионами Ca^{2+}), уникальность структуры и химических механизмов функционирования нуклеазы *Sm* представляется очевидной. В последующей публикации этой серии (сообщение II в настоящем журнале) нами обсуждаются особенности организации активного центра нуклеазы *Sm* и механизм ее катализитического действия.

Авторы благодарны А.Г. Уржумцеву, Н.Л. Луниной, С.В. Никонову, Н.А. Невской, А. Дементьеву, А. Антону, З. Даутер, К. С. Вильсону за содействие в работе и ценные обсуждения. При анализе модели были использованы программы RasWin (R. Sayle) и PC MAGE (R.M. Weiss & D.C. Richardson).

Работа была выполнена при поддержке грантов International Science Foundation (MG9000 и MG9300) и Российского фонда фундаментальных исследований (94-04-12844, 97-04-48319, 97-04-49772).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Филимонова М.Н., Баратова Л.А., Воспельникова Н.Д., Желтова А.О., Лещинская И.Б. // Биохимия. 1981. Т. 46. С. 1660–1665.
2. Vincent R.D., Hofman T.J., Zassenhaus H.P. // Nucleic Acids Res. 1988. V. 16. P. 3297–3312.
3. Zassenhaus H.P., Denniger G. // Curr. Genet. 1994. V. 25. P. 142–149.
4. Cote J., Ruiz-Carriro A. // Science. 1993. V. 261. P. 765–769.
5. Muro-Pastor A.M., Kuritz T., Flores E., Herrero A., Wolk C.P. // J. Bacteriol. 1994. V. 76. P. 1093–1098.
6. Филимонова М.Н., Дементьев А.А., Лещинская И.Б., Бакулин Г.Ю., Шляпников С.В. // Биохимия. 1991. Т. 56. С. 508–520.
7. Pedersen J., Filimonova M., Roepstorff P., Biedermann K. // Biochim. Biophys. Acta. 1993. V. 1202. P. 13–21.
8. Банникова Г.Е., Благова Е.В., Варламов В.П., Моргунова Е.Ю., Дементьев А.А., Шляпников С.В. // Биоорган. химия. 1990. Т. 16. С. 1678–1682.
9. Bannikova G.E., Blagova E.V., Dementiev A.A., Morygunkova E.Yu., Mikhailov A.M., Shlyapnikov S.V., Varlamov V.P., Vainshtein B.K. // Biochem. Int. 1991. V. 23. P. 813–822.
10. Miller M.D., Benedik M.J., Sullivan M.C., Shipley N.S., Krause K.L. // J. Mol. Biol. 1991. V. 222. P. 27–30.
11. Miller M.D., Tanner J., Alpaugh M., Benedik M.J., Krause K.L. // Nature Struct. Biol. 1994. V. 1. P. 461–468.
12. Brunger A.T. // Nature (London). 1992. V. 355. P. 472–474.
13. Lunin V.Yu., Skovoroda T.P. // Acta Cryst. 1995. A51. P. 880–887.
14. Urzhumtsev A.G., Skovoroda T.O., Lunin V.Yu. // J. Appl. Cryst. 1996. V. 29. P. 741–744.
15. Urzhumtsev A.G., Lunin V.Yu., Vernoslova E.A. // J. Appl. Cryst. 1989. V. 22. P. 500–506.
16. Ivanov M.E., Urzhumtsev A.G. // Joint CCP4 and ESF-EACBM Newsletter on Protein Crystallography. 1995. V. 31. P. 20–22.
17. Tong H., Guillemette J.G., Mauk A.G., Smith M., Brayer C.D. // J. Appl. Cryst. 1994. V. 27. P. 421–426.
18. Brunger A.T. // X-PLOR Manual. 1988. New-Haven: Yale University Press.
19. Jones T.A. // J. Appl. Cryst. 1978. V. 11. P. 268–272.
20. Jones T.A., Zou J.Y., Cowan S.W., Kjeldgaard M. // Acta Cryst. 1991. A47. P. 110–119.
21. Lastowski R.A., MacArthur M.W., Moss D.S., Thornton J.M. // J. Appl. Cryst. 1993. V. 26. P. 283–291.
22. Rose G.D., Giersch L.M., Smith J.A. // Adv. Prot. Chem. 1985. V. 37. P. 1–109.
23. Milner-White E.J., Ross B.N., Ismail R., Belhadj-Mastafa K., Poet R. // J. Mol. Biol. 1988. V. 204. P. 777–782.
24. Hutchinson E.G., Thornton J.M. // Protein Science. 1996. V. 5. P. 212–220.
25. Бушаров М.А. // Биофизика. 1997. V. 42. С. 753–764.
26. Miller M.D., Krause K.L. // Protein Science. 1996. V. 5. P. 25–34.