

УДК 577.151.02:577.152.314

ВНЕКЛЕТОЧНАЯ ЭНДОНУКЛЕАЗА *Serratia marcescens*. II. АМИНОКИСЛОТНЫЕ ОСТАТКИ АКТИВНОГО ЦЕНТРА И ГИПОТЕТИЧЕСКИЙ МЕХАНИЗМ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ ФЕРМЕНТА

© 1999 г. С. В. Шляпников, Е. В. Благова¹, В. М. Левдикова¹, В. Ю. Лунина²,
В. В. Лунина¹, А. М. Михайлов^{1*}, Х. Бетзель³, К. Р. Райшанкар³, М. Пербандт³

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

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

² Институт математических проблем биологии Российской академии наук,
Пушино, Московская область, 142292

³ Институт физиологической химии, Гамбургский университет, Гамбург, Германия, 22603

Поступила в редакцию 13.02.98 г.

На основании кристаллографического изучения атомной структуры внеклеточной эндонуклеазы *Serratia marcescens* [К. Ф. 3.1.4.9], сравнительного анализа аминокислотных последовательностей родственных белков и анализа описанных ранее каталитических характеристик фермента и его мутантных аналогов предложен механизм действия белка с участием остатков гистидина и глутаминовой кислоты, выполняющих обобщенную роль кислотно-основных катализаторов, а также карбоксильной и гуанидиновой групп остатков аспарагиновой кислоты и аргинина. Выявлены элементы сходства и различий структур активных центров нуклеазы и панкреатической ДНКазы I.

Ключевые слова: *Serratia marcescens*, внеклеточная эндонуклеаза, структура, механизм действия.

Ферменты метаболизма нуклеиновых кислот и, в частности нуклеодеполимеразы, играют ключевую роль в процессах реализации генетической информации. Нуклеодеполимеразы выполняют ряд регуляторных функций, находят широкое применение в качестве инструментов генетической инженерии и являются объектом биотехнологического производства, что обусловлено перспективностью их использования в качестве противовирусных и противоопухолевых препаратов и химических реагентов. Проведение фундаментальных исследований и решение задач практического применения нуклеодеполимераз в значительной степени ограничено уровнем знаний об общих принципах каталитического действия белковых молекул.

В литературе накоплено много данных о пространственной структуре и механизме действия РНКаз и ДНКаз, однако структурные исследования нуклеаз – ферментов, не проявляющих специфичности к химической природе углеводного компонента нуклеиновых кислот, существенно ограничены. В этой связи внимание многих исследователей привлечено к изучению внеклеточ-

ной эндонуклеазы патогенной грамотрицательной бактерии *Serratia marcescens* [К. Ф. 3.1.4.9] (нуклеаза *Sm*).

Нуклеаза *Sm* катализирует расщепление 3'-фосфодиэфирных связей в одно- и двухцепочечных ДНК и РНК с образованием 5'-фосфорилированных нуклеотидов [1] и является одним из структурных гомологов суперсемейства нуклеодеполимераз, выделенных из различных таксономически удаленных видов про- и эукариот. Установлены аминокислотные последовательности трех представителей этой группы белков, а именно, двух митохондриальных нуклеаз из *Saccharomyces cerevisiae* [2, 3] и *Bos taurus* [4], а также нуклеазы *Anabaena sp.* PCC 7120 [5], при этом общий уровень структурного сходства нуклеазы *Sm* с нуклеазами *S. cerevisiae* и *Anabaena* составляет 17%, а с нуклеазой *B. taurus* – 19%. Все нуклеазы представляют собой сахар-неспецифичные ферменты, некоторые из них, например нуклеаза *B. taurus*, обладают выраженной специфичностью к нуклеотидным последовательностям расщепляемых субстратов, в частности, гидролизуют преимущественно GC-пары оснований ДНК [6].

Нуклеаза *Sm* – металлозависимый фермент, он максимално активен при pH 6.5–8.0 в присутствии 5–10 mM Mg²⁺, при этом ионы Mg²⁺ могут

Принятые сокращения: нуклеаза *Sm* – внеклеточная эндонуклеаза *Serratia marcescens*.

*Эл. почта: amm@biostr.cryst.msk.ru

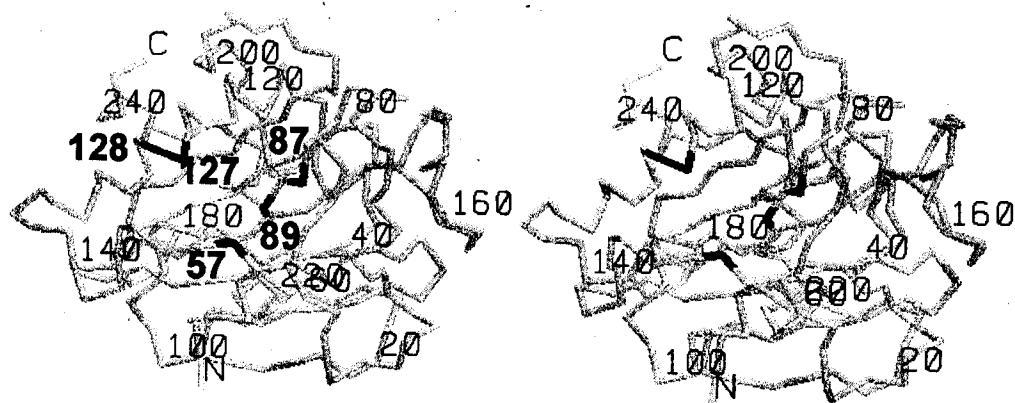


Рис. 1. Стереорепрезентация C_{α} -цепи нуклеазы *Sm* при кристаллографическом разрешении 1.7 Å [1]. Жирными линиями выделена область активного центра.

быть заменены с некоторой потерей каталитической эффективности ионами Mn^{2+} .

Начальные исследования нуклеазы *Sm* проводились с использованием гомогенных препаратов фермента, выделенных из природных штаммов бактерий [7–9], в последние годы достигнуты успехи в изучении экспрессии генов, секреции и получении рекомбинантных форм нуклеаз [10–12], что дает возможность получать мутантные белки с прогнозируемыми свойствами.

Некоторое время назад двумя независимыми группами ученых были начаты работы по рентгеноструктурному исследованию нуклеазы *Sm* [13, 14], в результате которых Миллер и соавт. [15] определили пространственную структуру белка с разрешением 2.1 Å, в дальнейшем эта структура была уточнена нами при разрешении 1.7 Å.

В данной работе рассмотрена структура активного центра нуклеазы *Sm* и на основании кристаллографических исследований нуклеазы, сравнительного анализа структурной организации функционально родственных белков и анализа каталитических свойств некоторых известных мутантных аналогов фермента предлагается химический механизм действия белка в рамках общего кислотно-основного катализа с участием остатков глутаминовой кислоты и гистидина, а также карбоксильной и гуанидиновой групп остатков аспарагиновой кислоты и аргинина.

В работе использовали координаты атомов ДНКазы I и нуклеазы *Sm*, не содержащих нуклеотидных субстратов, полученные в результате кристаллографического уточнения структур ферментов при разрешении 2.0 Å [16, 17] и 1.7 Å [1] соответственно из Protein Data Bank.

Компьютерный анализ пространственных структур белков проводили на интерактивной графической системе ESV 10/32 с использованием комплексов графических программ FRODO и O [18, 19].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Нуклеаза *Sm* до сих пор остается единственным представителем гомологичного семейства родственных белков с установленной пространственной структурой. Вместе с тем, нуклеаза *Sm* функционально подобна панкреатической ДНКазе I, хотя аминокислотная последовательность ДНКазы I [16] не имеет ярко выраженного сходства с последовательностью нуклеазы *Sm* [10, 11], а ее конформационная топология – $\alpha/\beta/\beta/\alpha$ [16, 17, 20, 21] – резко отличается от трехмерной структуры нуклеазы [1, 15] (рис. 1).

Каталитический центр ДНКазы I формируется двумя остатками гистидина – His-134 и His-252, связанными (ND1-атомы) водородными связями с карбоксилатными ионами Glu-78 и Asp-212 соответственно, а также, по-видимому, остатками Arg-9 и Glu-39 и (или) Asp-251 [20, 21]. Гуанидиновая группа Arg нейтрализует экстрастриктельный заряд у атома фосфора расцепляемой фосфодиэфирной связи, а остатки дикарбоновых кислот координированы с необходимыми для реакции ионами Ca^{2+} или Mn^{2+} . В целом, в случае ДНКазы I механизм донор-акцепторного взаимодействия с участием сопряженных молекул Glu-His- H_2O в известной мере подобен механизму действия классической каталитической триады Asp-His-Ser сериновых протеиназ.

В предварительных работах по кристаллографическому анализу нуклеазы *Sm* изучали свободный фермент, т.е. нуклеазу, не содержащую связанного с белком нуклеотида, поэтому информация о структуре активного центра и каталитических группах белка ограничена и определяется, главным образом, косвенными данными, полученными ранее [15] при симуляции комплексообразования нуклеазы с ДНК методом мониторингового моделирования и минимизации энергии с использованием компьютерной графики.

Таблица 1. Расстояния между атомами в аминокислотных остатках, входящих в активные центры нуклеазы *Sm* и ДНКазы I

Атомы аминокислотных остатков	Расстояние, Å	Атомы аминокислотных остатков	Расстояние, Å
Нуклеаза <i>Sm</i>		ДНКаза I	
His-89ND1–Glu-127OE1	6.64	His-134NE2–His-252NE2	6.12
His-89ND1–Glu-127OE2	5.88	His-134NE2–His-252ND1	7.05
His-89ND1–Asp-128OD2	13.18	His-134ND1–Glu-78OE1	4.23
His-89ND1–Asp-86OD2	9.89	His-134ND1–Glu-39OE1	4.23
His-89ND1–Arg-87NH1	10.53	His-134NE2–Glu-39OE2	6.49
His-89NE2–Arg-87NH1	11.05	His-134ND1–Asp-251OD1	9.71
His-89ND1–Arg-131NH1	9.82	His-134NE2–Asp-251OD1	8.49
His-89NE2–Arg-131NH2	11.75	His-134NE2–Arg-9NH1	11.17
Glu-127OE1–Arg-87NZ1	15.31	His-134ND1–Arg-9NH2	13.03
Glu-127OE2–Arg-87NZ1	15.15	His-252ND1–Asp-212OD2	2.67
Glu-127OE1–Asp-86OD2	10.61	His-252NE2–Glu-39OE1	6.92
Glu-127OE1–Asp-128OD2	7.19	His-252ND1–Glu-39OE1	8.27
Glu-127OE1–Arg-131NH1	5.71	His-252NE2–Asp-251OD1	5.49
Glu-127OE2–Arg-131NH2	7.42	His-252NE2–Asp-251OD1	4.24
Arg-87NH1–Asp-86OD1	6.84	His-252NE2–Arg-9NH1	9.2
Arg-87NH1–Asp-86OD2	8.29	Arg-9NH1–Glu-39OE2	6.79
Arg-87NH1–Asp-128OD2	20.32	Arg-9NH2–Glu-39OE2	6.99
Arg-131NH1–Asp-86OD2	15.65	Arg-9NH1–Asp-251OD1	5.42
Arg-131NH2–Asp-86OD2	15.18	Arg-9NH2–Asp-251OD1	7.44
Arg-131NH1–Asp-128OD2	6.99	Glu-39OE1–Asp-251OD1	6.80
Asp-86OD1–Asp-128OD1	16.10		

ДНК-связывающий центр нуклеазы *Sm* локализован между двумя основными N-(остатки 1–114) и C-концевыми (остатки 115–245) структурными субдоменами белка (рис. 1) и фланкирован двумя рядами кластеров положительно заряженных остатков аминокислот – Lys-48, Lys-55, Arg-57, Lys-60, Lys-84 и Arg-87 N-концевого домена и Arg-125, Arg-131, Lys-132, Arg-136 и Lys-196 C-концевого домена [1, 15], электростатические взаимодействия которых с фосфатными группами двухцепочечной молекулы ДНК обеспечивают возможность реализации белок-нуклеинового узнавания одного полного оборота двойной спирали в В-форме. Здесь же фиксированы остатки His-89 и Glu-127, которые также относятся к различным субдоменам нуклеазы, но представляют собой наиболее близко пространственно примыкающую к расщепляемому участку пару, с расстоянием 6.64 Å между атомами His-89 ND1 и Glu-127 OE1 (табл. 1).

Роль различных аминокислотных остатков нуклеазы *Sm* в катализе изучена мало и за исключением данных о важности остатков цистеина, образующих две внутримолекулярные дисульфидные связи (Cys-9–Cys-13 и Cys-281–Cys-243) [11], основана, главным образом, на результатах сайт-направленного мутагенеза [12]. С помощью сайт-

направленного мутагенеза получено 10 мутантов нуклеазы *Sm* с точечной заменой остатков His-26, His-45, Asp-86, Arg-87, His-89, Asp-117, Glu-127, Arg-131, Asp-208 и Glu-208 на Ala. Оказалось, что замены остатков His-26, His-45, Asp-117 и Asp-208 практически не влияли на активность нуклеазы, тогда как каталитические свойства мутантов с заменами в позициях 86, 87, 89, 127, 131 и 211 аминокислотной последовательности существенно изменялись. Замещение His-89Ala приводит к полной инактивации нуклеазы, а эффективность гидролиза ДНК (значение $k_{кат}/K_M$) мутантами Gln-127Ala, Arg-87Ala, Gln-211Ala, Asp-86Ala и Arg-131Ala уменьшается на два–три порядка по сравнению с немодифицированным природным ферментом [12].

Только мутант Glu-211Ala нуклеазы *Sm* (и в определенной мере Arg-131Ala) сохраняет субстрат-связывающие свойства нативного фермента, у всех остальных производных значение K_M при комплексообразовании с ДНК увеличивается более чем в 100 раз, свидетельствуя, по-видимому, в пользу предположения о многоточечности фермент-субстратного “узнавания”, обеспечиваемого комбинацией как полярных электростатических взаимодействий фермента с сахарофосфатным

остовом нуклеиновой кислоты, так и специфических гидрофобных контактов белка с основаниями нуклеотидов.

Результаты сайт-направленного мутагенеза нуклеазы *Sm* не позволяют однозначно отнести выявленные таким образом функционально значимые группы белка к каталитическим остаткам его активного центра, однако этот вывод отчасти поддерживается данными сравнительного анализа аминокислотных последовательностей нуклеазы *Sm* и белков родственного семейства (рис. 2), свидетельствующего о консервативности идентифицированных остатков у гомологичных ферментов.

Сопоставление первичных структур нуклеазы *Sm* и неспецифических нуклеаз *Anabaena sp.* PCC 7120, *S. cerevisiae* и *B. taurus* позволяет выделить пять областей консервативных аминокислотных последовательностей, в которых остатки нуклеазы *Sm* инвариантны для одного или нескольких сравниваемых белков: 21–57, 86–94, 107–150, 165–181, 199–235 (рис. 2). Кроме того, аминокислотные остатки Pro-67 и Ala-68 нуклеазы *Sm*, а также Leu-3 и Asn-245 идентичны соответствующим остаткам нуклеаз *Anabaena* и *S. cerevisiae*, а Ala-74 нуклеазы *Sm* сохраняется в нуклеазе *B. taurus*. В целом, во всех четырех белках консервативны только 23 аминокислотных остатка, причем шесть из них расположены в наиболее инвариантном участке 86–94 нуклеазы *Sm*, который включает в себя три каталитически важных (согласно данным сайт-направленного мутагенеза) остатка Asp-86, Arg-87 и His-89. Другие консервативные для всех нуклеаз остатки с ионогенными функциональными группами содержат “каталитические” остатки Glu-127, Arg-131 и Gln-211 и остаток Lys-172, каталитическая значимость которого не установлена.

Исходя из структурно-функционального подобия анализируемых нуклеаз логично предположить существование сходства трехмерных структур каталитических центров ферментов с участием тождественных специфических групп аминокислотных остатков. Вместе с тем, даже при очевидном несоответствии пространственных топологий нуклеазы *Sm* и ДНКазы I и особенностей механизма каталитического действия можно выявить ряд общих закономерностей в их структурной организации в области активных центров.

Предполагается, что два гистидиновых остатка ДНКазы I, His-134 и His-252, выступают в роли сопряженных кислотно-основных катализаторов, причем каждый из них может рассматриваться в качестве как активной нуклеофильной, так и электрофильной групп [16, 17, 20, 21]. Два существенных для катализа остатка нуклеазы *Sm* – His-89 и Glu-127 – расположены друг от друга приблизительно на том же расстоянии, что и His-134–His-252 ДНКазы I (табл. 1), и, таким образом, по-ви-

Таблица 2. Расстояния между атомами в активных центрах нуклеазы *Sm* и ДНКазы I, вычисленные путем совмещения их пространственных структур

Нуклеаза <i>Sm</i>	ДНКазы I	Расстояние, Å
<i>Вариант 1</i>		
His-89ND1	His-252ND1	1.0–1.5
Glu-127OE1	His-134ND1	1.5–2.0
Glu-127OE1	His-134NE2	1.5–2.0
Asp-86OD1	Glu-39OE2	6.2
Asp-86OD2	Glu-39OE2	4.1
Asp-86OD1	Asp-251OD1	7.5
Asp-86OD2	Asp-251OD1	7.2
Arg-87NH1	Arg-9NH2	6.1
Arg-87NH1	Arg-9NZ1	6.2
<i>Вариант 2</i>		
His-89ND1	His-134ND1	1.0–1.5
Asp-128OD1	Asp-251OD1	4.2
Asp-128OD1	Asp-251OD2	2.4
Arg-131NH1	Arg-9NH1	4.5
Arg-131NH2	Arg-9NH1	3.6
Glu-127OE1	His-252ND1	4.5–2.0
Glu-127OE2	His-252NE2	2.0

димо, потенциально функционально тождественны им в том случае, если His-134 и His-252 ДНКазы I являются аналогами Glu-127 нуклеазы *Sm* в качестве льюисовского основания и аналогами His-89 в качестве льюисовской кислоты. Эти два варианта вероятной структурной архитектуры активных центров ДНКазы I и нуклеазы *Sm* с учетом примерно равной удаленности His-89 и Glu-127 нуклеазы *Sm* и His-134, His-252 ДНКазы I от соответствующих “каталитических” остатков, Arg-87/Arg-131 и Asp-86 с одной стороны, и от Arg-9 и Glu-39/Asp-251 с другой, проанализированы с помощью суперпозиции активных центров ферментов с использованием компьютерной графики (табл. 2, рис. 3).

В первом из них (вариант 1, табл. 2), а именно, при предположении о функциональной эквивалентности остатков Glu-127 и His-89 нуклеазы и остатков His-134 и His-252 ДНКазы I и пространственном совмещении настоящих ионогенных пар двух ферментов, достигается максимальная топологическая сближенность “каталитических” остатков Arg-87 и Asp-86 нуклеазы *Sm* с Arg-9 и Glu-39/Asp-251 ДНКазы I соответственно. При этом гуанидиновая группа Arg-131 нуклеазы расположена вне активного центра и пространственно удалена от Arg-87 на 19–20 Å.

Характерной особенностью геометрии активного центра нуклеазы *Sm* по сравнению с ДНКазой I

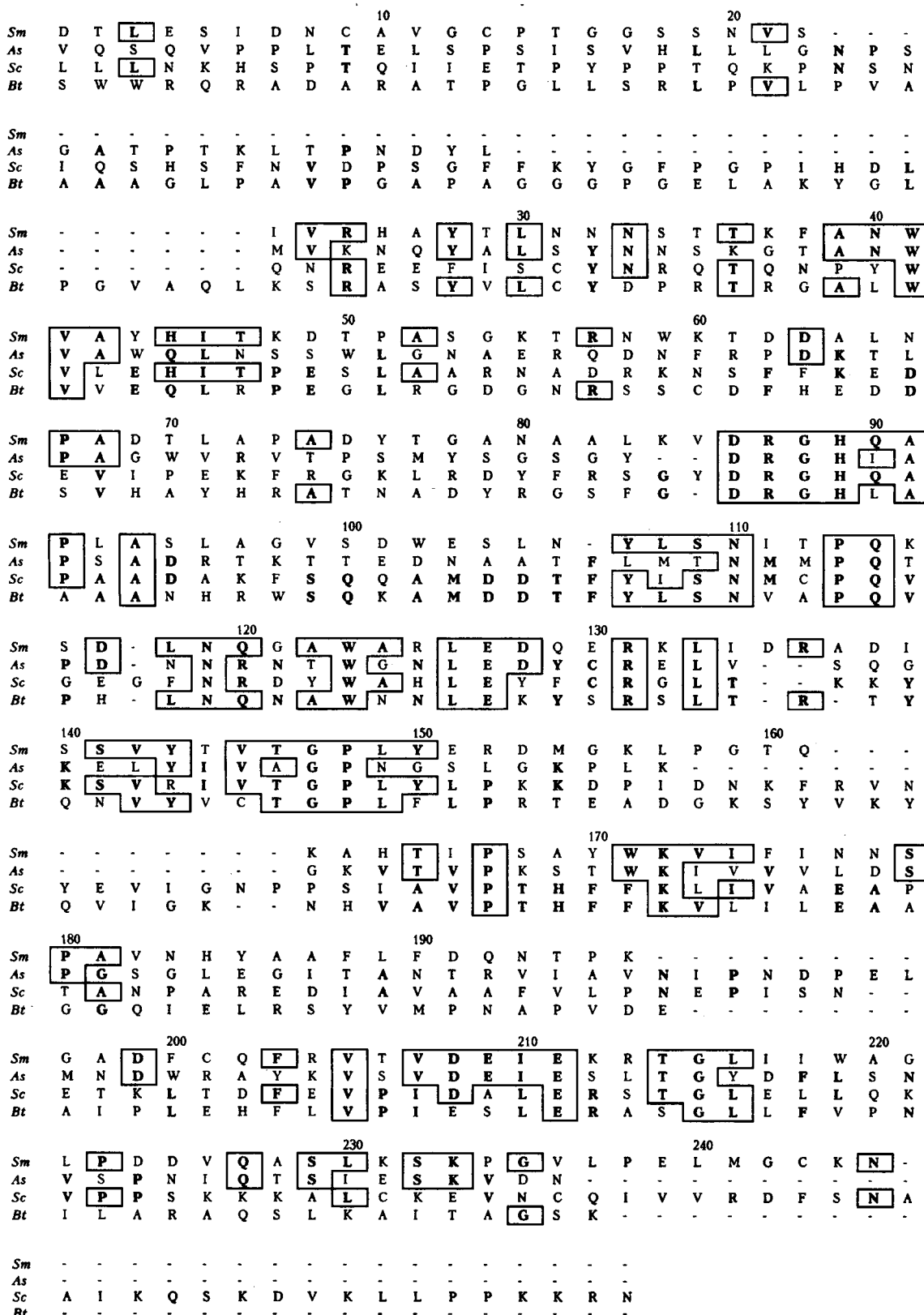


Рис. 2. Сравнение аминокислотных последовательностей нуклеазы *S. marcescens* (*Sm*), *Anabaena* sp. PCC 7120 (*As*), *S. cerevisiae* (*Sc*) и *B. taurus* (*Bt*). Жирным шрифтом выделены консервативные остатки нуклеаз. Аминокислотные остатки, идентичные аминокислотным остаткам нуклеазы *Sm*, заключены в рамки.

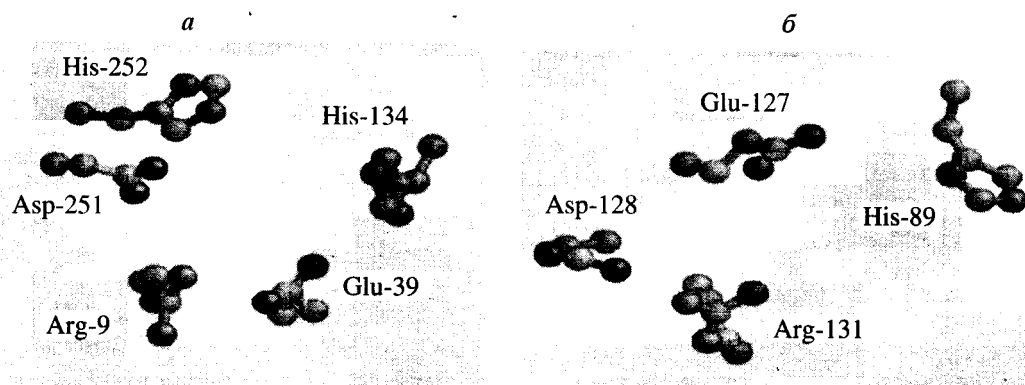


Рис. 3. Сравнение геометрии (вариант 2, табл. 2) активных центров ДНКазы I (а) и нуклеазы *Sm* (б).

является отсутствие водородной связи между имидазольным циклом His-89 и каким-либо карбоксильным радикалом белка, в том числе Glu-127. Консервативный для семейства гомологичных нуклеаз остаток Glu-211 (как и Lys-172) удален от каталитического центра фермента (расстояние His-89–Glu-211 составляет около 25 Å, а His-89–Lys-172 – 10–11 Å), и его функциональная роль неясна. Соответствующая мутация Glu/Ala в нуклеазе не приводит к глобальным конформационным перестройкам [12], не наблюдаемым и при образовании комплекса фермента с нуклеиновыми кислотами. В то же время у нуклеазы *Sm* карбоксильный остаток Asp-86 удален от “активного” His-89 на 9.9 Å и не может заметно влиять на состояние ионизации имидазольного радикала, протонированного при катализе. Таким образом, карбоксильная группа Asp-86 остается, по-видимому, единственным реальным кандидатом (подобно Gln-39/Asp-251 ДНКазы I), осуществляющим координацию функционально необходимых ионов двухвалентных металлов.

В альтернативном варианте суперпозиции активных центров сравниваемых ферментов (вариант 2, табл. 2), предполагающем каталитическую тождественность остатков His-89 нуклеазы и His-134 ДНКазы I (и Glu-127–His-252) и их топологическое соответствие, наблюдается геометрическая совместимость гуанидиновых радикалов Arg-9 ДНКазы I и Arg-131 нуклеазы *Sm*. Остаток Arg-87 нуклеазы *Sm* удален от расщепляемой в ходе каталитической реакции связи (*n*) и, принимая во внимание расстояния между близлежащими фосфатными группами нуклеотидной цепи, составляющие ~6.2 Å, взаимодействует, по всей видимости, с остатком (*n* + 2) фосфорной кислоты субстрата. В рассматриваемом случае карбоксильная группа Asp-86 нуклеазы расположена вне области активного центра и пространственно удалена от Glu-39 и Asp-251 ДНКазы I. При этом единственным структурно-функциональным эквивалентом Asp-251 ДНКазы I в нуклеазе *Sm* ос-

тается карбоксил-содержащий остаток Asp-128 (табл. 2, рис. 3).

Отсутствие экспериментальных данных о функциональной роли остатка Asp-128 нуклеазы *Sm* не исключает его возможного участия в ферментативном гидролизе по аналогии с карбоксильным остатком Asp-86. Вместе с тем, в ряду гомологичных нуклеаз этот остаток является вырожденным и сохраняется лишь в нуклеазе *Anabaena sp.* PCC 7120, хотя известно, что замена таких частично консервативных остатков, как His-45, Asp-117 и Asp-208 на Ala (рис. 2) не влияет на активность фермента.

Следует отметить, что рассматриваемый вариант суперпозиции нуклеазы *Sm* и ДНКазы I отчасти поддерживается определенной консервативностью остатков His-89 нуклеазы и His-134 ДНКазы I, что проявляется в частичном совпадении аминокислотных последовательностей в указанных фрагментах белков – His-Gln-Ala-Pro (нуклеаза *Sm*) и His-Ser-Ala-Pro (ДНКазы I) и может служить одной из важных предпосылок их возможного, функционального сходства.

В любом варианте общим, как минимум, является участие остатков Glu-127 и His-89 в механизме каталитического действия нуклеазы *Sm*.

Исходя из вышесказанного, а также учитывая результаты, полученные при изучении пространственной структуры нуклеазы, анализе аминокислотных последовательностей родственных белков и биохимических свойств известных мутантных аналогов фермента, мы предлагаем гипотетический механизм действия нуклеазы *Sm* с участием (в рамках общего кислотно-основного катализа) остатков глутаминовой кислоты, гистидина, связанных с белком ионов Mg^{2+} и одного из остатков аргинина.

В реакции, катализируемой нуклеазой *Sm*, важную роль играют остатки Asp-86/Asp-128, His-89, Glu-127 и Arg-87/Arg-131, – функциональные аналоги Glu-39/Asp-251, His-134 или His-252

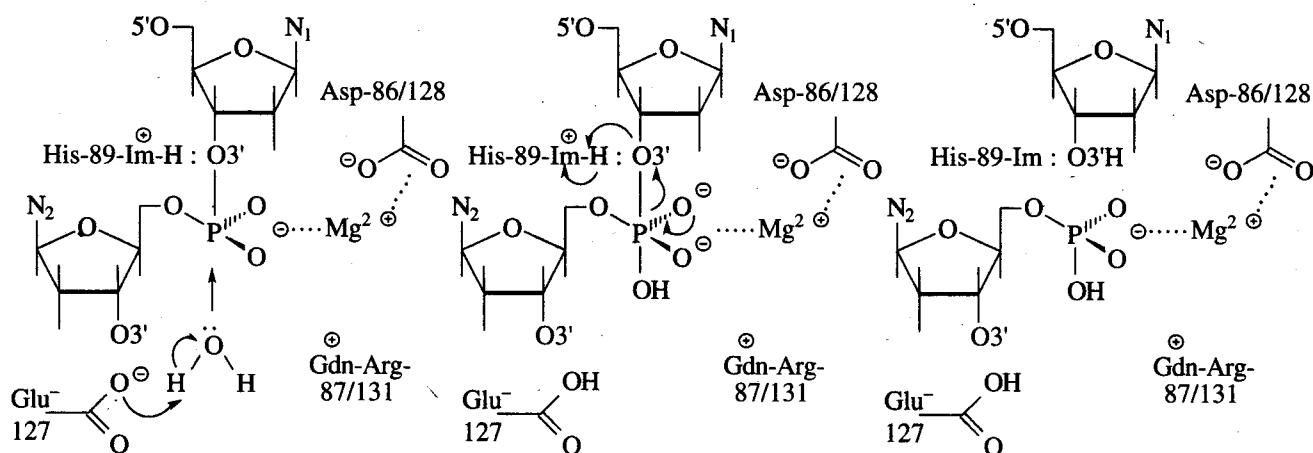


Рис. 4. Химический механизм каталитического действия нуклеазы *Sm*.

(или наоборот) и Arg-9 ДНКазы I соответственно. Согласно стереохимическим представлениям о гидролизе фосфодиэфирных связей [22] нуклеофильное замещение у атома фосфора в процессах этого типа протекает как реакция присоединения-отщепления с участием молекулы воды и образованием пентакоординированного промежуточного состояния, имеющего геометрию тригональной бипирамиды с атомом фосфора в центре и с подходящей и уходящей группами в вершинах бипирамиды, в плоскости основания которой находятся фосфорильная группа и связи с другими заместителями. Механизм нуклеофильного замещения предусматривает максимальный положительный заряд на центральном атоме фосфора в переходном состоянии в момент ухода заместителя в форме аниона. 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.

В нашей схеме (рис. 4) остаток Glu-127 выступает в роли обобщенного льюисовского основания и активирует молекулу воды с увеличением частичного отрицательного заряда у атома кислорода и, следовательно, усилением нуклеофильных свойств с последующей атакой фосфорной группы ориентированной против O3'-атома. Экстраотрицательный заряд у пентакоординированного фосфора в переходном состоянии нейтрализуется гуанидиновым радикалом одного из двух остатков Arg-87/131 и отчасти стабилизируется координированным соответственно с Asp-86 или Asp-128 ионом Mg^{2+} , корректирующим положение расщепляемой связи относительно белкового окружения. В свою очередь, положительно заряженный остаток имидазола His-89 играет роль обобщенной кислоты, протонируя уходящую O3'-группу.

В заключение следует отметить, что описанная схема молекулярного действия нуклеазы *Sm*, хотя и является в свете настоящих данных в достаточной степени вероятной, не исключает возможности иных механизмов катализа с участием связанных с ферментом ионов Mg^{2+} , предложенных для ряда других нуклеодеполимераз [23, 24]. Функциональная роль Mg^{2+} в случае нуклеазы *Sm* подобна его роли в ДНКазе I, тогда как в реакциях, катализируемых ДНК-полимеразой из *Escherichia coli*, необходимо участие двух ионов Mg^{2+} , один из которых активирует молекулу воды, а второй координирует 3'-атом кислорода уходящей группы [25]. В рестрикционных эндонуклеазах *EcoRI* и *EcoRV* уходящие группы протонируются водным окружением гидратированного иона Mg^{2+} с активацией атакующей молекулы воды фосфатной группой разрываемой связи [26]. Очевидно, что рассматриваемая в качестве кандидата на участие в активации молекулы воды группа должна обладать максимально большой основностью.

Детализация молекулярного механизма действия нуклеазы *Sm* требует дополнительной информации и анализа. В настоящее время нами проводится систематическое изучение кинетики гидролиза различных природных и синтетических олигонуклеотидов нуклеазой *Sm* и кристаллографическое изучение структуры комплексов белка с минимальными субстратами и их аналогами.

Авторы выражают благодарность А.Х. Мусолямову и Н.Г. Носовой (ИМБ РАН) за техническую помощь в работе.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Лунин В.Ю., Благова Е.В., Левдииков В.М., Лу-нин В.В., Шляпников С.В., Михайлов А.М. // Молекуляр. биология. 1999. Т. 33 (в печати).
2. Vincent R.D., Hofmann 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-Carrillo A. // *Science.* 1993. V. 261. P. 765–769.
5. Murro-Pastor A.M., Kuritz T., Flores E., Herrero A., Wolk C.P. // *J. Bacteriol.* 1994. V. 176. P. 1093–1098.
6. Cote J., Renaud J., Ruiz-Carrillo A. // *J. Biol. Chem.* 1989. V. 264. P. 3301–3310.
7. Филимонова М.Н., Балабан Н.П., Шарунова Ф.Р., Лецинская И.Б. // *Биохимия.* 1980. Т. 45. С. 2096–2103.
8. Yonetura K., Matsumoto K., Maeda H. // *J. Biochem.* 1983. V. 93. P. 1287–1295.
9. Филимонова М.Н., Дементьев А.А., Лецинская И.Б., Бакунина Г.Ю., Шляпников С.В. // *Биохимия.* 1991. Т. 56. С. 508–520.
10. Ball T.K., Saurugger P.N., Benedik M.J. // *Gene.* 1987. V. 57. P. 183–192.
11. Biedermann K., Jepsen P.K., Riise E., Svenson J. // *Carlsberg Res. Commun.* 1989. V. 54. P. 17–27.
12. Frindhoff P., Gimadutdinov O., Pingoud A. // *Nucleic Acids Res.* 1994. V. 22. P. 3280–3287.
13. Bannikova G.E., Blagova E.V., Dementiev A.A., Morgunova E.Yu., Mikhailov A.M., Shlyapnikov S.V., Varlamov V.P., Vainshtein B.K. // *Biochem. Int.* 1991. V. 23. P. 813–822.
14. Miller M.D., Benedik M.J., Sallivan M.C., Shipley N.S., Krause K.L. // *J. Mol. Biol.* 1991. V. 222. P. 27–30.
15. Miller M.D., Tanner J., Alpaugh M., Benedik J., Krause K.L. // *Nature Struc. Biol.* 1994. V. 1. P. 461–468.
16. Suck D., Oefner C. // *Nature.* 1986. V. 321. P. 620–625.
17. Suck D., Lahm A., Oefner C. // *Nature.* 1988. V. 332. P. 464–468.
18. Jones T.A. // *J. Appl. Cryst.* 1978. V. 11. P. 268–272.
19. Jones T.A., Zou J.Y., Cowan S.W., Kjeldgaard M. // *Acta Cryst.* 1991. A. 47. P. 110–119.
20. Lahm A., Suck D. // *J. Mol. Biol.* 1991. V. 222. P. 645–667.
21. Weston S.A., Lahm A., Suck D. // *J. Mol. Biol.* 1992. V. 226. P. 1237–1256.
22. Mehdi S., Gerlt J.A. // *Biochemistry.* 1984. V. 23. P. 4844–4852.
23. Yang W., Hendrickson W.A., Crouch R.J., Satow Y. // *Science.* 1990. V. 249. P. 1398–1405.
24. Davies J.F., Hostomska Z., Hostomsky Z., Jordan S.R., Matthews D. // *Science.* 1991. V. 252. P. 88–95.
25. Joyce C.M., Steitz T.A. // *Annu. Rev. Biochem.* 1994. V. 63. P. 772–822.
26. Jeltsch A., Alves J., Wolfes H., Maas G., Pingoud A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1993. V. 90. P. 8499–8503.