



УДК 577.152.314.02

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЭНДОНУКЛЕАЗ *Serratia marcescens* И *Physarum polycephalum* И МОЛЕКУЛЯРНЫЙ МЕХАНИЗМ ИХ ДЕЙСТВИЯ

© 2002 г. С. В. Шляпников*, В. В. Лушин**, Е. В. Благова**, Л. В. Абатуров*,
М. Пербандт***, Х. Бетзель***, А. М. Михайлов***

* Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва;

** Институт кристаллографии им. А.В. Шубникова РАН, Москва, 117333,
Ленинский просп., 59, Россия;

*** Институт физиологической химии, Гамбург, Германия

Поступила в редакцию 17.01.2001 г. Принята к печати 12.04.2001 г.

Проведено сравнение структуры и функциональных характеристик природной нуклеазы *Serratia marcescens* семейства ДНК/РНК-неспецифичных эндонуклеаз, ее мутантных форм и нуклеазы I-PpoI *Physarum polycephalum* подгруппы Cys-His-кластерсодержащих белков суперсемейства высокоспецифичных интронкодируемых “homing”-ДНКаз. Показано, что, несмотря на отсутствие гомологии в аминокислотных последовательностях и в целом различной топологии нуклеаз *S. marcescens* и I-PpoI, активные центры ферментов имеют близкую структуру. Нуклеазы содержат в активном центре единственный уникальный ион магния, вовлеченный в каталитический процесс в составе гидратной оболочки координационно связанного водно-магниевого комплекса. Mg²⁺-ион в фермент-субстратных комплексах хелатирован остатком аспарагина, координационно связан с двумя кислородными атомами ДНК и стабилизирует переходное состояние фосфоаниона и 3'-ОН-группы уходящего нуклеотида. Предложен новый, нетривиальный для рестрикционных и “homing”-эндонуклеаз, но общий для нуклеаз *S. marcescens* и I-PpoI механизм расщепления фосфодиэфирных связей, включающий остаток гистидина в качестве общего основания для активации не лигандированной магнием молекулы воды при нуклеофильном “in line”-замещении 3'-уходящей группы. Напряженный металл-фермент-субстратный комплекс образуется в процессе гидролиза и релаксирует в исходное состояние в ходе реакции.

Ключевые слова: *Serratia marcescens*; *Physarum polycephalum*; эндонуклеазы, структура, свойства, механизм действия.

ВВЕДЕНИЕ

Эндонуклеазы осуществляют гидролиз фосфодиэфирных связей в ДНК и РНК и объединяют обширную группу ферментов, неполнота изученности которых в ряде случаев обуславливает мозаику белых пятен на карте метаболизма нуклеиновых кислот. В последнее десятилетие достигнут значительный прогресс в изучении двух экстремально различающихся по субстратной специфичности нуклеаз – сахарнеспецифичной нуклеазы *Serratia marcescens* (*Sma*, КФ 3.1.30.2) и высокоспецифичной интронкодируемой нуклеазы I-PpoI из *Physarum polycephalum* (номенклатура [1]). Оба фермента расщепляют 3'-5'-фосфодиэфирные связи с образованием 5'-фосфорилированных олигонуклеотидов. При этом нуклеаза *Sma* способна примерно с равной эффективностью

гидролизовать одно- и двухцепочечные формы ДНК и РНК с незначительной избирательностью в отношении их вторичной структуры и нуклеотидной последовательности, тогда как нуклеаза I-PpoI узнает лишь асимметричную последовательность 15–40 п.о. соответствующего интронобразующего центра двухспиральной ДНК [2, 3].

Sma- и I-PpoI-нуклеазы – наиболее изученные представители двух функционально родственных суперсемейств нуклеолитических ферментов с разнообразными биологическими функциями. *In vivo* интронкодируемая нуклеаза I-PpoI инициирует сайт-специфичный перенос мобильной группы гена от одной интронсодержащей аллели хромосомы к другой и принадлежит к группе так называемых Cys-His-кластеробразующих цинксвязывающих белков [4]. Нуклеаза *Sma* – структурный гомолог семейства ДНК/РНК-неспецифичных ферментов про- и эукариотического происхождения. Ферменты этого класса принимают участие в многочисленных биологических процессах: ба-

Сокращения: прТрп – тимидин-3',5'-бис(*n*-нитрофенилфосфат); аббревиатура нуклеаз приведена в тексте.

Автор для переписки (тел.: (095) 135-54-20; эл. почта: amm@biostr.crystal.msk.ru).

циллярные нуклеазы обеспечивают прежде всего питательную функцию микроорганизмов при клеточном росте, в свою очередь, эукариотические нуклеазы вовлечены в процессы репаративного синтеза, репликации и рекомбинации митохондриальной ДНК [5, 6]. Все представители обоих суперсемейств нуклеаз являются металлрегулируемыми ферментами.

Некоторое время назад тремя независимыми группами исследователей начаты работы по рентгеноструктурному анализу нуклеаз *Sma* и *I-PpoI*, в результате которых определена пространственная структура апоформы нуклеазы *Sma* с разрешением 2.1 [7] и 1.7 Å [8], уточненная нами до атомного уровня для Mg^{2+} -содержащего холофермента (см. сообщение [9]), и опубликованы структуры кристаллических комплексов нуклеазы *I-PpoI* с ДНК и продуктами ее деградации [10]. В настоящее время получен ряд мутантных производных нуклеаз и изучены их биохимические свойства, что с определенной долей вероятности позволило идентифицировать каталитически важные остатки белков [11–13].

В данной работе проводится сравнение кристаллографических структур активных центров нуклеаз *Sma* и *I-PpoI*, анализируется структурная организация родственных белков и функциональные свойства их мутантных аналогов и в рамках указанных ограничений предлагается наиболее вероятный общий химический механизм действия ферментов.

В работе использованы координаты атомов Brookhaven Protein Data Bank в структурах *I-PpoI*-нуклеазы с разрешением 1.8 Å [10] (PDB 1A73, 1A74 и 1CZO) и нуклеазы *Sma* с разрешением 1.07 Å [9]. Суперпозицию структур ферментов проводили с использованием программ FRODO [14] и SwissPdbViewer [15]. В суперпозицию включали водно-магниевые комплексы белков, остатки His89 и His98 для нуклеаз *Sma* и *I-PpoI*, соответственно, и остатки 108–113 и 116–119.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ферментативные реакции, в отличие от других многообразных гомогенных или гетерогенных каталитических превращений, протекают в обладающей относительной конформационной подвижностью кооперативной системе, содержащей субстрат, кофакторы и надлежащим образом ориентированные функциональные группы белка, обеспечивающие образование или разрыв ковалентных связей в субстрате. Любое рассмотрение молекулярных механизмов каталитического расщепления фосфодиэфирных связей нуклеиновых кислот требует описания, как минимум, трех основных crucialных процессов, а именно: активации атакующей разрываемую связь нуклеофила, стабилизации переходного состояния фосфоаниона и протонирования уходящей группы. Структурные исследования ферментов выявляют возможность

той или иной необходимой, хотя и не достаточной, механистической предпосылки, являющейся основой реализации этих основополагающих химических догм.

Нуклеолитическая активность ферментов метаболизма нуклеиновых кислот, как правило, регулируется ионами двухвалентных металлов. Универсальным кофактором большинства нуклеаз за некоторым исключением являются Mg^{2+} -ионы [16]. Эндонуклеазы *Sma* и *I-PpoI* представляют собой редкий пример ферментов, в которых каталитически важный ион магния взаимодействует только с одним белковым лигандом – остатком аспарагина. Эффект координирования двухвалентных ионов металлов, в частности ионов Ca^{2+} , амидными группами белков известен из данных литературы [17], однако ни один из описанных белков не является нуклеазой, и, кислородный атом амидной группы остатков Asn или Gln обычно участвует в дополнительных взаимодействиях, в том числе с атомами остова полипептидной цепи, а атом азота этой группы связан с карбоксильными группами остатков аспарагиновой или глутаминовой кислот.

Согласно общепринятым представлениям, связанный с нуклеазами Mg^{2+} -кофактор функционирует в роли льюисовской кислоты, понижая основность молекулы воды, выступающей затем в качестве нуклеофильного агента или основания [18]. Вместе с тем последние данные кристаллографических исследований нуклеазы *Sma* с атомным разрешением [9] показывают уникальность пространственного строения этого белка и структуры его активного центра, а отсутствие скольконибудь заметных аналогий с другими нуклеолитическими ферментами позволяет предположить, что молекулярный механизм действия нуклеаз может быть более разнообразен, чем это представлялось до настоящего времени [18].

Высокий уровень гидратации Mg^{2+} -белкового комплекса нуклеазы *Sma* и консервативность структуры магнийсвязывающего центра для семейства функционально гомологичных ферментов (рис. 1) являются косвенным подтверждением возможности участия координированных ионом металла молекул воды в ферментативно-регулируемых химических реакциях. В большинстве нуклеаз (но не в *Sma*- и *I-PpoI*-нуклеазе) водно-магниевый кластер обладает повышенной конформационной подвижностью, свободно вращается на поверхности белковых глобул и его вовлечение в каталитический процесс опосредованно взаимодействиями внешней сферы гидратной оболочки комплекса [28]. В соответствии с этим механизмом, Mg^{2+} -кофактор осуществляет стабилизацию переходного состояния фосфоаниона в результате электростатических взаимодействий и/или участвуя в образовании водородных связей субстрата с гидратированным ионом металла

Ana	S	G	Y	D	R	G	H	I	A	P	S	A	D	R	T	K	-	T	T	E	D	N	A	A	T	F	-	L	M	T	N	M	M	P	Q	T	P	D	-	N	N	R	N	T	W	G	N	L	E	D	Y	C	R	E	L	V			
Dme	S	G	F	D	R	G	H	L	A	A	A	G	N	H	H	L	-	Q	Q	N	H	C	A	E	D	T	F	F	L	-	T	N	I	A	P	Q	V	G	Q	-	G	F	N	R	S	A	W	N	N	L	E	Q	Y	V	R	N	L	V	
Gga	T	G	L	N	R	G	H	L	N	P	S	G	H	H	S	-	D	S	-	S	S	R	A	A	T	F	S	L	-	T	N	I	V	P	Q	N	E	K	-	L	N	G	G	A	W	N	N	Y	E	Q	Q	T	M	M	R	L	A		
Cje	S	G	Y	T	R	G	H	T	A	P	N	A	S	F	X	X	-	-	-	K	A	A	Q	N	S	V	F	L	-	M	S	N	I	T	P	Q	N	A	Q	-	I	N	X	K	I	W	N	X	I	E	Q	R	E	R	N	L	A		
Spa	S	G	Y	D	R	G	H	Q	V	P	A	D	C	N	K	F	-	S	Q	L	A	V	D	Q	T	F	Y	L	-	S	N	M	C	P	Q	V	G	D	-	G	F	N	R	N	Y	W	A	Y	F	E	D	W	C	R	R	L	T		
Cel	S	G	F	D	R	G	H	L	A	-	A	A	G	N	H	R	K	S	-	S	Q	K	A	M	D	D	T	F	Y	L	-	S	N	M	S	P	Q	V	G	R	-	G	F	N	R	D	K	W	N	D	L	E	G	F	C	R	R	V	A
Tbr	R	G	L	S	R	G	H	M	A	-	A	A	Q	D	A	K	S	-	S	T	V	E	L	A	Q	T	F	Y	L	-	N	A	N	T	V	P	Q	D	M	T	-	M	N	A	V	D	W	L	R	L	E	N	L	T	R	K	L	R	
Cec	S	G	F	D	R	G	H	L	A	-	A	A	G	N	H	R	W	-	S	Q	R	A	M	D	D	T	F	Y	L	-	S	N	M	S	P	Q	V	G	I	-	G	F	N	R	H	V	W	A	Y	L	E	G	F	C	R	S	L	T	
Scs	S	G	Y	D	R	G	H	Q	V	P	A	A	A	N	H	R	W	-	S	Q	K	A	M	D	D	T	F	Y	L	-	S	N	M	C	P	Q	V	G	E	-	G	F	N	R	D	Y	W	A	H	L	E	K	Y	F	C	R	G	L	T
Hsa	S	G	F	D	R	G	H	L	A	A	A	A	N	H	R	W	-	S	Q	R	A	M	D	D	T	F	Y	L	-	S	N	V	A	P	Q	V	P	M	-	L	N	Q	N	A	W	N	L	E	K	Y	S	R	S	L	T				
Mmu	S	G	F	D	R	G	H	L	A	A	A	A	N	H	R	W	-	S	Q	R	A	M	D	D	T	F	Y	L	-	S	N	V	A	P	Q	V	P	M	-	L	N	Q	N	A	W	N	L	E	K	Y	S	R	S	L	T				
Bta	S	G	F	D	R	G	H	L	A	A	A	A	N	H	R	W	-	S	Q	R	A	M	D	D	T	F	Y	L	-	S	N	V	A	P	Q	V	P	M	-	L	N	Q	N	A	W	N	L	E	K	Y	S	R	S	L	T				
Bbu	S	G	Y	D	R	G	H	I	V	S	A	D	M	S	F	-	S	E	N	A	M	K	D	D	T	Y	F	L	-	S	N	M	S	P	Q	K	S	E	-	F	N	S	G	I	W	L	K	L	E	V	R	K	L	I					
Sma	L	K	V	D	R	G	H	Q	P	L	A	S	L	A	G	V	S	-	D	W	E	S	L	N	-	Y	L	-	S	N	I	T	P	Q	K	S	D	-	L	N	Q	G	A	W	A	R	L	E	D	Q	V	E	R	K	L	I			

Рис. 1. Аминокислотные последовательности фрагментов белков семейства ДНК/РНК-неспецифичных нуклеаз и нуклеазы *I-PpoI*. Жирным шрифтом выделены остатки, идентичные остаткам нуклеазы *Sma*. Остатки нуклеаз *Sma* и *I-PpoI*, взаимодействующие с H_2O-Mg^{2+} -кластером, отмечены снизу звездочкой. Обозначения нуклеаз: *Ana* – *Anabaena sp.* PCC 7120 (остатки 118–170, Gene Bank X64706) [19]; *Dme* – *Drosophila melanogaster* (76–129, GB AC004340) [3]; *Gga* – *Gallus gallus* (136–187, GB 073911) [3]; *Cje* – *Campylobacter jejuni* (33–84, GB RCJ01399) [3]; *Spa* – *Schizosaccharomyces pombe* (136–189, GB Z73099) [20]; *Cel* – *Caenorhabditis elegans* (587–640, GB AF003740) [20]; *Tbr* – *Trypanosoma brucei* (215–268, GB U43702) [20]; *Cec* – *Cunnighamella echinulata* (81–134, GB AF043517) [21]; *Scs* – *Saccharomyces cerevisiae* (132–185, GB X06670) [22]; *Hsa* – *Homo sapiens* (135–187, GB X79444) [23]; *Mmu* – *Mus musculus* (132–184, GB X99395) [24]; *Bta* – *Bos taurus* (137–189, GB X72802) [25]; *Bbu* – *Borrelia burgdorferi* (39–91, GB RBB00337) [26]; *Sma* – *Serratia marcescens* (83–134, GB M19495) [27]; *I-PpoI* – *Physarum polycephalum* (92–134, GB M38131) [10]. Выравнивание аминокислотных последовательностей проведено вручную на основе максимального соответствия структур белков.

(рис. 2). В *Sma*-нуклеазе Mg^{2+} -ион координирован пятью молекулами воды, ориентация которых фиксирована жесткой системой водородных связей с близрасположенными аминокислотными остатками активного центра фермента (см. рис. 5 [9] и ниже), что существенно снижает конформационную разупорядоченность кофактора и ограничивает его ротационную подвижность. Молекулы воды в водно-магниево-комплексе *Sma*-нуклеазы строго упорядочены, их температурные факторы составляют значения от 8.4 до 13.2 Å².

Основная проблема дискриминирования внешне- и внутрисферных механизмов магнийрегулируемых реакций нуклеазы *Sma* связана с отсутствием прямых структурных данных о каких-либо взаимодействиях фермента с нуклеотидными субстратами. В этой связи представляется информативным рассмотрение структур Mg^{2+} -связывающего центра нуклеазы *I-PpoI* и ее специфических нуклеотидных комплексов.

Эндонуклеазы *Sma* и *I-PpoI* принадлежат к разным подгруппам эволюционно дистанцированных ферментов, но, резко различаясь по субстратной специфичности и аминокислотным последовательностям (рис. 1), обладают весьма близкими биохимическими свойствами [12, 13]. Обе нуклеазы примерно равноэффективны при гидролизе прdТрп – искусственного хромофорсодержащего минимального субстрата ферментов – тимидин-3',5'-бис(*n*-нитрофенилфосфата). Недавно опубликованы пространственные структуры двух кристаллических комплексов *I-PpoI*-нуклеазы с разрешением 1.8 Å [10]. В одном из них *I-PpoI*-нуклеаза ассоциирована с 3'-тиозамещенным негидролизуемым аналогом специфической ДНК, в другом – с продуктами расщепления природного субстрата. Активный центр нуклеазы содержит Mg^{2+} -ион, ко-

ординационно связанный с водным окружением и остатком Asn119.

Нуклеаза *I-PpoI* состоит из 163 а. о. [10] (*Sma*-нуклеаза – 245 а.о. [27]) и представляет собой гомодимерную молекулу размером 25 × 35 × 80 Å со смешанной α/β-структурной топологией. Каждый из мономеров белка формируется тремя антипараллельными β-цепями, фланкированными двумя α-спиралями и протяженной малоупорядоченной C-концевой петлей, и стабилизируется двумя Zn^{2+} -содержащими кластерами [10].

Несмотря на кардинальные различия в общей пространственной топологии нуклеаз *Sma* и *I-PpoI* и отсутствие сходства первичных структур белков, суперпозиция их 3D-структур при одновременном сопоставлении только одного из мономеров димерных молекул каждого из белков выявляет значительные перекрытия C^α-атомов полипептидных цепей в участках 76–124 и 81–122 для *Sma*- и *I-PpoI*-нуклеаз, соответственно, с незначительными вариациями в размерах некоторых петель, свидетельствуя таким образом о близости топологий активных центров ферментов (рис. 3). Обе нуклеазы содержат Mg^{2+} -кофактор, остаток ас-

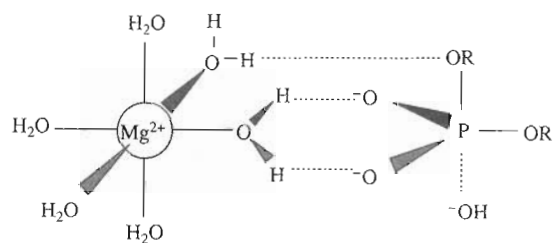


Рис. 2. Схема стабилизации переходного состояния гидролизуемого фосфоаниона субстрата внешней оболочкой гидратной сферы водно-магниевого кластера нуклеаз.

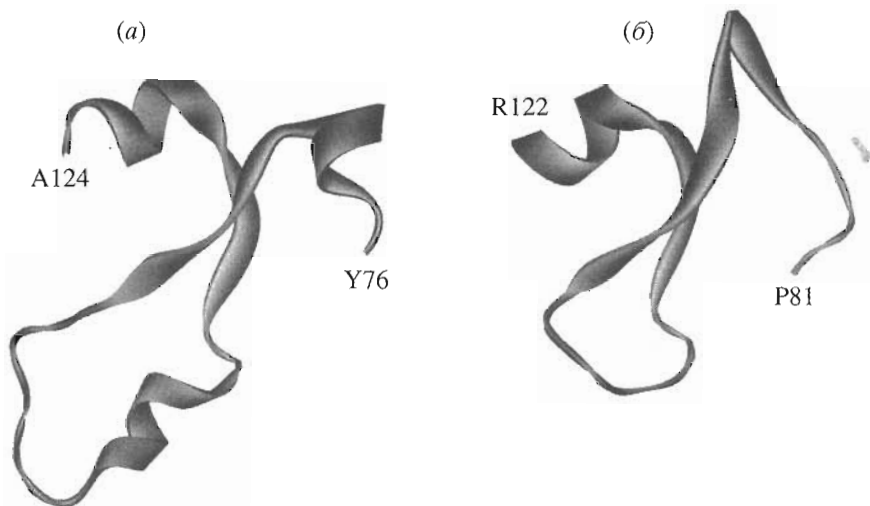


Рис. 3. Топология фрагментов вторичных структур нуклеаз *Sma* (а) и *I-PpoI* (б).

парагина (Asn119 в обоих белках) и остатки гистидина (His89 для *Sma*- и His98 для *I-PpoI*-нуклеазы) и аргинина (Arg57 для *Sma*- и Arg61 для *I-PpoI*-нуклеазы), остающихся инвариантными для двух соответствующих семейств функционально родственных белков. Гуанидиновые группы остатков Arg нуклеаз расположены относительно ионов магния и остатков His89/98 и Asn119 в сходном положении и среднеквадратичные (rms) отклонения в координатах атомов водно-магниевого кластера нуклеаз не превышают 0.4 Å, а для соответствующих остатков боковых групп His и Asn119 – 0.5–0.6 Å (рис. 4). Rms-отклонения для C α -атомов основной цепи 25 а. о. активных центров белков составляют 1.2–1.3 Å.

Ярко выраженное соответствие геометрий активных центров и структур водно-магниевого ко-

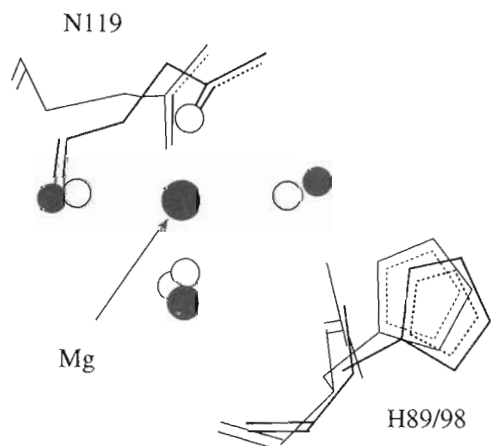


Рис. 4. Суперпозиция остатков активного центра нуклеаз *Sma* (тонкие линии) и *I-PpoI* (толстые линии) и их водно-магниевого кластера (открытые кружки – молекулы воды в Mg $^{2+}$ -комплексе *Sma*-нуклеазы, зачерненные – *I-PpoI*-нуклеазы).

факторов нуклеаз *Sma* и *I-PpoI* предполагают возможность реализации ферментами схожего для обоих белков химического механизма гидролиза фосфодиэфирных связей. В комплексе *I-PpoI*-нуклеазы с продуктами расщепления ДНК 3'-кислород дезоксирибозного остатка нуклеотида координирован с ионом Mg $^{2+}$, поэтому, если принять это же справедливым для *Sma*-нуклеазы, можно ожидать, что 3'-О-атом связанного нуклеинового субстрата занимает положение молекулы (с) водно-магниевого кластера фермента [9] (рис. 5). Это контрастирует с обычно наблюдаемой для магнийактивируемых ферментов, включая и рестриктонные нуклеазы, ролью иона металла, опосредованной через взаимодействия с внешней координационной сферой гидратированного иона [28], и свидетельствует в пользу механизма гидролитической реакции с непосредственным вовлечением субстрата в координацию с Mg $^{2+}$ -кофактором.

Активный центр *Sma*-нуклеазы, как уже отчасти упоминалось выше, формируется по крайней мере восемью аминокислотными остатками, в том числе Arg57, Asp86, His89, Gln114, Asn119 и Glu127 и, кроме того, Asn106 и Gln120, первые из которых консервативны в семействе ДНК/РНК-неспецифических ферментов, а два последних переменны (рис. 1). Аминокислотная последовательность *I-PpoI*-нуклеазы также содержит подобные и инвариантные для гомологичной группы Cys-His-кластеробразующих белков [4] остатки Arg61, His98, Asn119 и Cys105, эквивалентные соответственно Arg57, His89, Asn119 и Asn106 нуклеазы *Sma*, а инвариантный в *Sma* семействе нуклеаз Gln114 соответствует консервативному остатку Glu114 *I-PpoI*-нуклеазы.

Аминокислотные остатки активного центра нуклеаз выполняют различные функции. Остатки Asp86, Gln114, Asn119, Glu127, Asn106 и Glu120

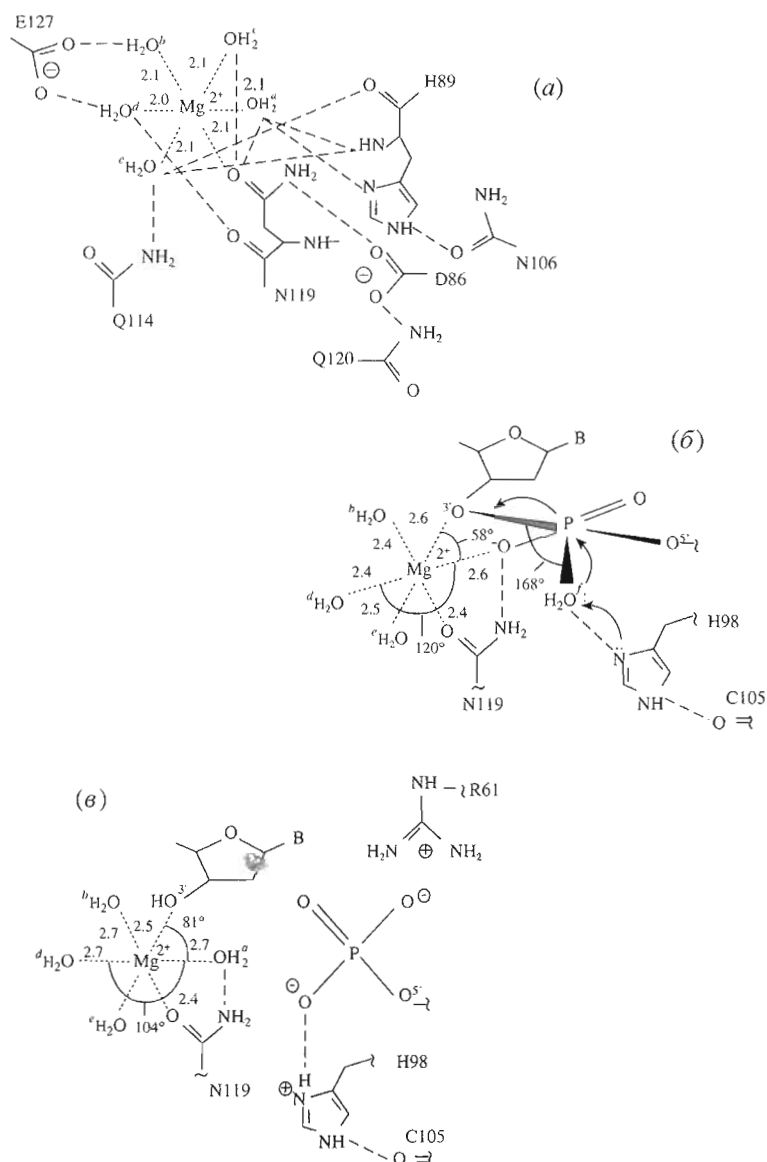


Рис. 5. Структура и геометрия водно-магниевого кластера в активном центре нуклеаз и механизм расщепления фосфодиэфирных связей. *a* – холоноклеаза *Sma*; пунктирными и точечными линиями показаны водородные и координационные связи; *b* – комплекс I-*PpoI*-нуклеазы с нерасщепленной ДНК; *в* – комплекс I-*PpoI*-нуклеазы с продуктами гидролиза субстрата. Приведены расстояния (Å) между ионом магния и лигандированными молекулами воды и атомами кислорода и углы между некоторыми связями. Детальное описание см. в тексте.

Sma-нуклеазы, также как Asn106, Asn119 и Cys105 нуклеазы I-*PpoI* вовлечены во взаимодействия с водно-магниевого кластером. Каталитическая значимость остатков Arg57, Asp86, His89 и Glu127 нуклеазы *Sma* вытекает из данных сайт-направленного мутагенеза белка [11, 12].

Последние четыре из перечисленных остатков *Sma*-нуклеазы, мутагенез которых сопровождается резким падением каталитических свойств фермента, расположены в активном центре в непосредственной близости друг от друга. Среди соответствующих мутантных форм белка His89Ala и Glu127Ala-мутанты обладают наименьшей остаточной нуклеолитической активностью при-

родного белка, составляющей соответственно <0.001 и 0.1%.

Ранее мы [8] и группа Краузе с сотрудниками [7] предположили, что остаток Asp86 участвует в хелатировании иона Mg^{2+} , а Glu127 и His89 выступают в качестве обобщенного льюисовского основания и кислоты соответственно. Вместе с тем согласно гипотезе Стоддарда и соавторов [10], остаток гистидина выполняет роль обобщенной льюисовской кислоты и участвует в стабилизации переходного состояния пентакоординированного фосфоаниона, тогда как молекула воды гидратной сферы Mg^{2+} -иона депротонируется общим основанием, выступая в качестве атакующего

нуклеофила. Однако консервативные в семействе сахарнеспецифичных нуклеаз остатки Asp86 и Glu127 не имеют тождественных остатков в нуклеазах I-*PpoI*-группы и взаимодействуют с водно-магниевым кластером *Sma*-нуклеазы лишь опосредованно. Остаток Asp86 на ~ 7 Å удален от Mg^{2+} -связывающего центра (рис. 5а) и образует водородные связи с остатками Asn119 и Glu120, расстояние (d) между которыми составляет 2.9 Å, а остаток Glu127, будучи связан водородными связями с водным окружением Mg^{2+} -иона ($d(H_2O^b) = 2.5$ и $d(H_2O^d) = 2.7$ Å), не может функционировать в качестве общего основания, так как Glu127Ala-мутация природного белка практически не сказывается на каталитической эффективности гидролиза прdTrп [12].

В то же время анализ пространственного строения активного центра нуклеаз показывает, что ни одна из координированных металлом молекул воды не может служить нуклеофильным агентом в реакциях расщепления фосфодиэфирных связей, протекающих по S_N2 -механизму. В составе *Sma*-холонуклеазы конфигурация водно-магниевого кластера приближается к идеальной: среднее значение расстояний между ионом Mg^{2+} и лигандированными атомами кислорода составляют 2.07 Å, и все углы между ними (не считая диаметрально расположенных лигандов) близки к 90° (рис. 5а). Подобная же геометрия наблюдалась в комплексах I-*PpoI*-нуклеазы с продуктами гидролиза нуклеиновых субстратов (рис. 5в).

В противоположность этому, в структуре фермент-субстратного комплекса I-*PpoI*-нуклеазы [10] конфигурация Mg^{2+} - H_2O -кластера претерпевает существенные возмущения (рис. 5б). В составе E-S-комплекса Mg^{2+} -ион взаимодействует с 3'-кислородным атомом уходящей группы нуклеотида и одним из несвязанных кислородов фосфатной группы, что сопровождается заметной линейризацией соответствующего угла между ними, составляющего в этом случае $\sim 58^\circ$. Комплементарный угол между тем же кислородным атомом фосфата и молекулой H_2O^d равен 120° , тогда как другие ортогональные углы Mg^{2+} -кофактора близки к 90° . Все водные молекулы хелатированного металла расположены таким образом, что их H_2O -P-O3'-углы не превышают 90° , что исключает нуклеофильную атаку координированных Mg^{2+} -кластером молекул воды.

Остаток His89 *Sma*-нуклеазы (His98 для I-*PpoI*) остается единственным потенциальным кандидатом на функцию общего основания. Остаток гистидина не может выполнять роль льюисовской кислоты при расщеплении нуклеиновых кислот, так как при этом His89Ala-мутант мог бы гидролизовать (вследствие значительно меньшего значения $pK_a \sim 7.1$ *n*-нитрофенольной группы сравнительно с $pK_a \sim 16$ уходящей группы нуклеотидного субстрата) и синтетический субстрат прdTrп, но он

не обладает такой способностью. В кристаллографической структуре нуклеазы *Sma* высокого разрешения (рис. 4 [9]) только NE2-атом имидазольной группы His89 протонирован, соответствующий остаток гистидина нейтрален и образует водородные связи с молекулами воды H_2O^a (d 2.7–3.0 Å) и H_2O^e (d 2.9–3.1 Å).

В структуре фермент-субстратных комплексов нуклеазы I-*PpoI* остаток His98 расположен оптимально к расщепляемой фосфодиэфирной связи. Вместе с тем, по данным рентгенодифракционного анализа, в области активного центра E-S-комплексов отчетливо проявляется пик, соответствующий локализации упорядоченной молекулы растворителя (H_2O^f , рис. 5б) в позиции, близкой к ранее занимаемой молекулой H_2O^a в гидратной сфере Mg^{2+} -кофактора холонуклеазы *Sma*. Молекула H_2O^f удалена от атома фосфора гидролизуемого субстрата на 3.9 Å, при этом H_2O^f -P-O3'-угол составляет 168° . Эта молекула связана водородной связью с ND1-атомом His98, находящимся от нее на расстоянии 2.6 Å. Отсюда следует, что His89/98 функционирует в нуклеазах в качестве общего основания, активирует молекулу H_2O^f , выступающую в роли атакующего фосфодиэфирную связь нуклеофила, и, по-видимому, принимает участие в стабилизации переходного состояния фосфоаниона. Макроскопическая величина pK_a нуклеофильной молекулы растворителя, не ассоциированной с каким-либо катионом или другой электрофильной группой, значительно превышает соответствующее значение металлгидратированных молекул. Однако незаряженный остаток гистидина активного центра нуклеаз с $pK_a \sim 6$ является сильным основанием при депротонировании и активации такой молекулы, поскольку как в холонуклеазе *Sma*, так и в E-S-комплексах I-*PpoI*-нуклеазы, связан водородной связью с карбонильной группой Asn106 (d 2.8 Å) или Cys105 (в E-S-комплексе d 2.8 Å, в E-P – d 3.4 Å) соответственно.

Mg^{2+} -связанный кофактор нуклеаз в свою очередь выполняет три взаимосвязанные функции. Прежде всего, прямое взаимодействие иона металла с гидролизуемой фосфатной группой подтверждает, что ион металла стабилизирует промежуточный фосфоанион и 3'-гидроксианион уходящей группы. Во-вторых, молекула воды внутренней координационной сферы металла отдает протон 3'-гидроксиальной группе расщепленного нуклеотида и Mg^{2+} -ион понижает pK_a этой молекулы, способствуя таким образом облегченному переносу протона. В-третьих, координированный ион магния в E-S-комплексах нуклеаз образует геометрически искаженный асимметричный октаэдрический комплекс с окружающими его атомами белка, растворителя и субстрата, который после расщепления последнего релаксирует до практически идеальной симметричной конфигурации.

В дополнение к сказанному выше проведенное уточнение кристаллографической модели *Sma*-нуклеазы при атомном разрешении в анизотропном приближении позволяет более достоверно описать структуру фермента, в частности, положение боковых групп аминокислотных остатков. Это особенно важно для остатков активного центра фермента. В этом отношении остаток Arg57 *Sma*-нуклеазы обращает на себя особое внимание. Мы отмечали ранее, что остаток Arg57 расположен в одном из наиболее дезорганизованных сегментов белка Thr50-Lys60, предполагая возможность его вовлечения в конформационные флуктуации в ходе каталитического процесса [8, 9]. В более ранней модели нуклеазы *Sma*, уточненной при разрешении 1.7 Å в изотропном приближении [8], средние значения температурных факторов для атомов остатка Arg57 в *A*- и *B*-субъединицах димера *Sma*-нуклеазы (23.51 и 22.75 Å² соответственно) примерно в полтора-два раза превышали аналогичные величины для соседних остатков. Столь высокое значение *B*-факторов необычно для остатка, экранированного от водного окружения, тем более для остатка аргинина, обычно образующего солевые связи с кислотными группами белка. Согласно настоящим данным, остаток Arg57 имеет две альтернативные *A/B*-конформации боковой цепи с заселенностью 0.6 и 0.4 для каждой молекулы димера, стабилизированные водородными связями.

Суперпозиция активных центров нуклеазы *Sma* и ДНК-*I-PpoI*-нуклеазного комплекса показывает, что связывание субстрата не сопровождается дезорганизацией структуры белков, свидетельствуя таким образом в пользу того, что структура ДНК вблизи расщепляемой фосфодиэфирной связи, по-видимому, одинакова в обоих ферментах. Это предположение поддерживается возможностью контактирования и электростатического взаимодействия близрасположенных к гидролизуемой связи 3'- и 5'-фосфатных групп субстрата с инвариантными в семействе сахарнеспецифичных нуклеаз остатками Arg87 и Arg131 (рис. 6). Оба остатка аргинина важны для активности нуклеазы *Sma*, однако их функциональная роль, как и для Arg57, скорее всего, ограничивается участием в связывании субстрата, так как, по данным сайт-направленного мутагенеза, замена их аланиновым остатком приводит к значительному (50–100-кратному) увеличению значения K_m , сравнительно с небольшим (1.3–1.9-кратным) уменьшением значений k_{cat} [11].

Серия конформационных изменений наблюдается в активном центре нуклеазы *I-PpoI* при расщеплении ДНК. Так, свободная 5'-фосфатная группа в продуктах гидролиза смещается чуть более чем на 2.5 Å от ее положения в субстратном комплексе и электростатически контактирует с расположенным на расстоянии 2.8 Å от нее гуани-

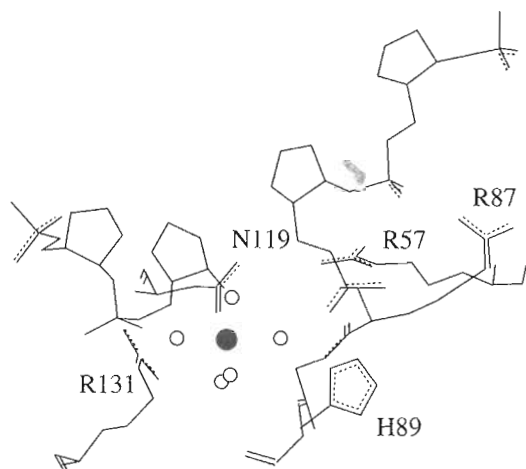


Рис. 6. Модель E-P-комплекса нуклеазы *Sma*. Приведена сахарофосфатная цепь тетрануклеотида, локализованная в соответствии с данными PDB 1A73.

диновым остатком Arg61 (*B*-конформер *Sma*-нуклеазы), который в свою очередь сдвигается от исходного состояния (*A*-конформер там же) на ~0.5–0.6 Å. Подобные конформационные изменения сопровождаются нарушением соответствующих Mg²⁺-OP-взаимодействий, приводя к добавлению четвертой координированной молекулы воды к внутренней сфере иона металла, релаксируемой к симметричной октаэдрической геометрии, когда в значительной степени линейаризованные углы между координационными связями Mg²⁺-иона восстанавливаются на ~20°. Средние значения ортогональных углов координационной сферы Mg²⁺-кофактора составляют теперь 89.6°. Ион магния сохраняет свое положение, взаимодействуя с Asn119 и 3'-гидроксианионом уходящей группы расщепленного нуклеотида.

В соответствии с настоящими данными переходное состояние фосфоаниона стабилизируется имидазольным радикалом остатка гистидина в результате полярного взаимодействия в E-S-комплексе молекулы воды и иона металла и сохраняется в комплексе фермента с продуктами гидролиза (расстояние между имидазолом остатка His и 5'-фосфатной группой нуклеотида – 3.4 Å). Остаток Arg активного центра нуклеаз находится на расстоянии ~5–6 Å от расщепляемой фосфодиэфирной связи и, по-видимому, не принимает участия в стабилизации переходного состояния, стабилизируя E-P-комплекс.

Резюмируя, мы предлагаем наиболее вероятный механизм действия нуклеаз *Sma* и *I-PpoI*, который укладывается в рамки общего кислотно-основного катализа с участием функционально важных остатков аргинина, гистидина, аспарагина и водно-магниевого кофактора ферментов. Гидролиз фосфодиэфирных связей протекает в процессе нуклеофильного замещения у атома фосфора как реакция присоединения-отщепления с

участием некоординированной ионом металла молекулы воды и образованием промежуточного пентакоординированного соединения, имеющего геометрию тригональной бипирамиды 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 нуклеаз выступает в роли общего основного катализатора, акцептируя протон от молекулы воды растворителя, которая представляет собой атакующий нуклеофил. 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 сфера гидратированного магниевого кластера нуклеаз непосредственно вовлечена в процесс катализа, выполняя, как и остаток аспарагина, функцию стабилизации промежуточного фосфорана и протонируя 3'-оксианион уходящей группы в качестве льюисовской кислоты. Остаток аргинина участвует в электростатической стабилизации продуктов гидролиза субстратов.

Следует отметить, что механизм специфического ферментативного гидролиза ДНК с участием гистидинового остатка, активирующего молекулу нуклеофила, атакующую фосфодиэфирную связь, является уникальным среди рестрикционных и "homing"-эндонуклеаз с известной в настоящее время структурой. Активные центры нуклеаз такого рода, как правило, содержат один-два остатка карбоксилсодержащих кислот, которые координируют ионы металлов-кофакторов и/или активируют молекулу атакующего нуклеофила, и один из остатков основных аминокислот (обычно лизин), который участвует в стабилизации переходного состояния [29]. Так, "homing"-эндонуклеаза *PI-SceI* из *S. cerevisiae*, относящаяся к типу II рестрикционных нуклеаз, содержит в каталитическом центре остаток Lys и два остатка Asp [30], а в нуклеазах *I-CreI* из *Chlamydomonas reinhardtii* и *I-CeuI* из *C. eugametos* вместо одного из двух остатков аспарагина имеется один каталитически важный остаток Glu [31, 32]. В *I-CreI*-нуклеазе остаток Lys заменен на Arg. Нуклеазы *I-PpoI* и *Sma* сохраняют подобный набор функционально значимых остатков при абсолютном требовании необходимого для катализа остатка гистидина. В большинстве рестрикционных эндонуклеаз атакующая фосфодиэфирную связь молекула воды активируется вторым ионом металла-кофактора или посредством субстратассоциированного механизма активации [33, 34]. В противоположность этому, нуклеазы *I-PpoI* и *Sma* содержат один ион металла в активном центре, и остаток His выполняет роль общего основания при активации атакующего нуклеофила.

Одной из отличительных особенностей нуклеаз *I-PpoI* и *Sma* является необходимость наличия Mg^{2+} -связанного иона для *I-PpoI*-нуклеазы при гидролизе *prdTpn* и отсутствие такого требования для нуклеазы *Sma* [12, 13]. Мы полагаем, что это несоответствие может быть отражением различной конформационной стабильности остатка Asn119 в активном центре ферментов. Функциональная роль Mg^{2+} -иона в качестве льюисовской кислоты не является абсолютно необходимой при расщеплении *n*-нитрофениловых эфиров субстрата, не требующего протонирования уходящей группы нуклеотида. Вместе с тем модификация остатка Asn119, приводящая к полному ингибированию нуклеаз [11–13], показывает, что Asn119 обеспечивает не только координацию магния, но и является донором протона в водородной связи с расщепляемой фосфорильной группой. Повышенная конформационная упорядоченность остатка Asn119 в нуклеазе *Sma* сравнительно с нуклеазой *I-PpoI*, обеспечиваемая сеткой межатомных взаимодействий с соседствующими группами белковой глобулы, в частности с Asp86 и Gln120, консервативными для всего семейства сахарнеспецифичных нуклеаз и отсутствующими в семействе ДНК-специфичных ферментов, позволяет предположить возможность участия Asn119 нуклеазы *Sma* в каталитическом гидролизе *prdTpn* даже в отсутствие Mg^{2+} -кофактора.

В заключение мы полагаем, что предложенный молекулярный механизм действия нуклеаз – общий в дивергентно-дистанцированном семействе гомологичных ферментов, типичными представителями которых они являются. Вместе с тем отсутствие сходства первичных структур нуклеаз *Sma* и *I-PpoI*, относящихся к разным семействам белков, при сохранении общего молекулярного механизма действия, по-видимому, следствие их конвергентного пути эволюции.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность В.М. Левдикову (Институт кристаллографии РАН, Москва) за полезные замечания при обсуждении работы в ходе подготовки рукописи к публикации.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (№ 00-04-48321 и № 01-04-48715).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Dujon B., Belfort M., Butow R.A., Jacq C., Lemieux C., Perlman P.S., Vogt V.M. // *Gene*. 1989. V. 82. P. 115–118.
2. Muscarella D.M., Vogt V.M. // *Cell*. 1989. V. 56. P. 443–454.
3. Meiss G., Gast F.-U., Pingoud A. // *J. Mol. Biol.* 1999. V. 288. P. 377–390.
4. Belfort M., Roberts R. // *Nucl. Acids Res.* 1997. V. 25. P. 3379–3388.

5. Benedik M.J., Strych U. // FEMS Microbiol. Lett. 1998. V. 165. P. 1–13.
6. Беляева М.И., Капранова М.Н., Витол М.И., Голубенко И.А., Лецинская И.Б. // Микробиология. 1976. Т. 45. С. 420–424.
7. Miller M.D., Tanner J., Alpaugh M., Benedik M.J., Krause K.L. // Nature Struct. Biol. 1994. V. 1. P. 461–468.
8. Lunin V.Yu., Levnikov V.M., Shlyapnikov S.V., Blagova E.V., Lunin V.V., Wilson K.S., Mikhailov A.M. // FEBS Lett. 1997. V. 412. P. 217–222.
9. Шляпников С.В., Лунин В.В., Благова Е.В., Пербандт М., Бетзель Х., Михайлов А.М. // Биоорганическая химия. 2001. Т. 27. С. 417–425.
10. Flick K.E., Jurica M.S., Monnat R.J., Stoddard B.L. // Nature. 1998. V. 394. P. 96–101.
11. Friedhoff P., Kolmes B., Gimadudinow O., Wende W., Krause K., Pingoud A. // Nucl. Acids Res. 1996. V. 14. P. 2632–2639.
12. Kolmes B., Kranke I., Friedhoff P., Pingoud A. // FEBS Lett. 1996. V. 397. P. 343–346.
13. Mannino S.J., Jenkins C.L., Raines R.T. // Biochemistry. 1999. V. 38. P. 16178–16186.
14. Jones T.A. // J. Appl. Cryst. 1978. V. 26. P. 268–272.
15. Guex N., Peitsch M.C. // Electrophoresis. 1997. V. 18. P. 2714–2723.
16. Wilcox D.E. // Chem. Rev. 1996. V. 96. P. 2435–2458.
17. McPhalen C.A., Strynadka N.C., James M.N.G. // Adv. Prot. Chem. 1991. V. 42. P. 77–144.
18. Jurica M.S., Stoddard B.L. // Cell and Molec. Life Sci. 1999. V. 55. P. 1304–1326.
19. Muro-Pastor A., Flores E., Herrero A., Wolk C. // Mol. Microbiol. 1992. V. 6. P. 3021–3030.
20. Meiss G., Franke I., Gimadudinow O., Urbanke C., Pingoud A. // Eur. J. Biochem. 1998. V. 251. P. 924–934.
21. Ho H.C., Shian P.E., Liu F.C., Chung J.G., Chen L.Y. // Eur. J. Biochem. 1998. V. 256. P. 112–118.
22. Vincent R.D., Hofman T.J., Zassenhaus H.P. // Nucl. Acids Res. 1988. V. 16. P. 3297–3312.
23. Tiranti V., Rossi E., Ruiz-Carrillo A., Rossi G., Rocchi M., DiDonato S., Zuffardi O., Zevinuti M. // Genomics. 1995. V. 25. P. 559–564.
24. Prats E., Noel M., Letourneau J., Titanti V., Vague J., Debon R., Zeviani M., Cornudella L., Ruiz-Carrillo A. // DNA Cell Biol. 1997. V. 16. P. 1111–1122.
25. Ruiz-Carrillo A., Cote J. // Science. 1993. V. 261. P. 765–769.
26. Fraser C.M., Casjens S., Huang W.M., Sutton G.G., Clayton R., Lathigra R., White O., Ketchum K.A., Dodson R., Hickey E.K., Gwinn M., Dougherty B., Tomb J.-F., Fleischmann R.D., Richardson D. // Nature. 1997. V. 390. P. 580–586.
27. Biedermann K., Jepsen P.K., Riise E., Svendsen I. // Carlsberg Res. Commun. 1989. V. 54. P. 17–27.
28. Cowan J.A. // Chem. Rev. 1998. V. 98. P. 1067–1087.
29. Aggarwal A.K., Wah D.A. // Curr. Opin. Struct. Biol. 1998. V. 8. P. 19–25.
30. He Z., Crist M., Yen H., Duan X., Quijcho F.A., Gimble F.S. // J. Biol. Chem. 1998. V. 273. P. 4607–4615.
31. Turmel M., Otis C., Cote V., Lemieux C. // Nucl. Acids Res. 1997. V. 25. P. 2610–2619.
32. Jurika M.S., Monnat R.J., Stoddard B.L. // Mol. Cell. 1998. V. 2. P. 469–476.
33. Jeltsch A., Alves J., Wolfes H., Maass G., Pingoud A. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1993. V. 90. P. 8499–8503.
34. Horton N.C., Newberry K.J., Perona J.J. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1998. V. 95. P. 13489–13494.

A Comparative Structure–Function Analysis and Molecular Mechanism of Action of Endonucleases from *Serratia marcescens* and *Physarum polycephalum*

S. V. Shlyapnikov*, V. V. Lunin**, E. V. Blagova**, L. V. Abaturov*, M. Perbandt***, Ch. Betzel***, and A. M. Mikhailov***

*Phone: +7 (095) 135-5420; e-mail: amm@biostr.crystal.msk.ru

*Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 32, Moscow, 117984 Russia

**Shubnikov Institute of Crystallography, Russian Academy of Sciences, Leninskii prosp. 59, Moscow, 117333 Russia

***Institute of Physiological Chemistry, Notkestrasse 85, Hamburg, 22603 Germany

Structural and functional characteristics were compared for wild-type nuclease from *Serratia marcescens*, which belongs to the family of DNA/RNA nonspecific endonucleases, its mutational forms, and the nuclease I-PpoI from *Physarum polycephalum*, which is a representative of the Cys-His box-containing subgroup of the superfamily of extremely specific intron-encoded homing DNases. Despite the lack of sequence homology and the overall different topology of the *Serratia marcescens* and I-PpoI nucleases, their active sites have a remarkable structural similarity. Both of them have a unique magnesium atom in the active site, which is a part of the coordinatively bonded water–magnesium complex involved in their catalytic acts. In the enzyme–substrate complexes, the Mg²⁺ ion is chelated by an Asp residue, coordinates two oxygen atoms of DNA, and stabilizes the transition state of the phosphate anion and 3'-OH group of the leaving nucleotide. A new mechanism of the phosphodiester bond cleavage, which is common for the *Serratia marcescens* and I-PpoI nucleases and differs from the known functioning mechanism of the restriction and homing endonucleases, was proposed. It presumes a His residue as a general base for the activation of a non-cluster water molecule at the nucleophilic in line displacement of the 3'-leaving group. A strained metalloenzyme–substrate complex is formed during hydrolysis and relaxes to the initial state after the reaction. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2002, vol. 28, no. 1; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: endonucleases, mechanism of action, properties, structure, *Physarum polycephalum*, *Serratia marcescens*