



УДК 577.152.314+577.151.02

РЕНТГЕНОСТРУКТУРНЫЙ АНАЛИЗ МАГНИЙСОДЕРЖАЩЕЙ ЭНДОНУКЛЕАЗЫ *Serratia marcescens*

© 2001 г. С. В. Шляпников*, В. В. Луния**, Е. В. Благова**,
М. Пербандт***, Х. Бетзель***, А. М. Михайлов***

* Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, 117984, ул. Вавилова, 32, Россия;

** 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 06.03.2001 г.

Уточнена пространственная кристаллическая структура ДНК/РНК-неспецифической эндонуклеазы *Serratia marcescens* в анизотропном приближении при разрешении 1.07 Å и результирующими значениями R - и R_{free} -факторов 12.4 и 15.3%. Структура включает 3924 неводородных атома, 715 связанных с белком молекул воды и содержит один ион магния в активном центре каждой из субъединиц гомодимерной молекулы нуклеазы. Выявлена 3D-топология фермента, показана внутренняя симметрия мономеров в N - и C -концевых частях молекул и определено локальное окружение магний-кофактора в активном центре нуклеазы. Установлено, что Mg^{2+} -ион связан с остатком Asn199 белка и окружен пятью молекулами воды, координированными в октаэдрической конфигурации. Координационные расстояния в водно-магниевом комплексе между молекулами воды и $\text{O}^{\delta 1}$ -атомом Asn119 составляют 2.01–2.11 Å. Температурные факторы для связанного Mg^{2+} в субъединицах равны 7.08 и 4.60 Å², а средние температурные факторы для окружающих молекул воды – 11.14 и 10.30 Å² соответственно. Локализована область субъединичных взаимодействий и показано наличие альтернативных конформаций боковых цепей для 51 аминокислотного остатка димерной формы белка.

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

ВВЕДЕНИЕ

В последние годы накоплена обширная информация о пространственной архитектуре и механизме действия ряда специфических РНКаз и ДНКаз, однако структура и каталитический механизм нуклеаз, неспецифических или малоспецифических к природе углеводного компонента нуклеиновых кислот остаются пока еще малоизученными. Это одна из причин повышенного интереса к исследованию внеклеточной эндонуклеазы патогенной грамотрицательной бактерии *Serratia marcescens* (*Sma*).

Sma-нуклеаза (КФ 3.1.30.2) обладает противовирусным и противоопухолевым действием и благодаря ее высокой каталитической активности и стабильности к детергентам и химическим денатурантам находит широкое применение при удалении нуклеиновых кислот из биохимических и фармацевтических препаратов. Фермент является объектом биотехнологического производства под коммерческим названием Benzopase (Merck).

Эндонуклеаза *Sma* с примерно равной эффективностью катализирует расщепление 3'–5'-фос-

фодиэфирных связей одно- и двухцепочечных ДНК, РНК и их гибридов с образованием тетра-, три-, ди- и, в меньшей степени, мононуклеотидов с 5'-фосфорилированными и 3'-ОН-концами, проявляя ограниченную селективность к нуклеотидным последовательностям [1]. *Sma*-нуклеаза принадлежит к суперсемейству металлзависимых ферментов, обладающих в ряду разнообразных прокариотических и эукариотических организмов выраженной консервативностью аминокислотных последовательностей [1–4], и является наиболее охарактеризованным с биохимической и структурной точки зрения членом этого семейства.

Нуклеаза представляет собой димер, состоящий из двух идентичных по первичной последовательности субъединиц с 245 а.о. в каждой. Нуклеолитическая активность фермента проявляется только в присутствии ионов двухвалентных металлов (Mn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} и Cd^{2+}), среди которых ионы Mg^{2+} являются наиболее предпочтительными. Ионы Ca^{2+} не активируют *Sma*-нуклеазу [5–7]. В настоящее время получен ряд мутантных аналогов фермента и исследованы их биохимические характеристики и функциональные свойства, что позволило с определенной долей вероятности выявить существенные для ката-

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

лиза аминокислотные остатки активного центра белка [8]. После получения кристаллов нуклеазы, пригодных для рентгеноструктурного анализа [9, 10], и определения пространственного строения апофермента при разрешении 2.1 Å [11], уточненного позднее при разрешении 1.7 Å [12], структура *Sma*-нуклеазы стала парадигмой всего семейства функционально-родственных белков.

Вместе с тем предварительный кристаллографический анализ структуры *Sma*-нуклеазы в отсутствие какого-либо связанного с белком нуклеотидного субстрата, его аналогов и ионов-кофакторов оставлял открытым вопрос о локализации и функциональной роли металлсвязывающего центра и ограничивал идентификацию каталитических групп холофермента непрямыми методами. Как следствие этого – наличие многочисленных спекулятивных и зачастую взаимно исключающих друг друга механистических схем каталитического действия нуклеазы [8, 11–13], остающегося до сих пор недостаточно обоснованным и требующим большей структурной детализации.

В настоящем и следующем за ним сообщении нами представлены результаты уточнения атомной структуры *Sma*-нуклеазы в присутствии ионов Mg^{2+} при разрешении 1.07 Å и описано расположение и геометрия водно-магниевого кластера активного центра нуклеазы. На основании этих данных, а также сравнения и анализа структур и свойств природной и мутантных форм белка и его гомологов предложен наиболее вероятный химический механизм функционирования фермента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Рентгенографические параметры кристаллов, используемых для уточнения атомной структуры нуклеазы *Sma* при разрешении 1.07 Å, и значения статистических характеристик конечной модели белка суммированы в табл. 1. В качестве стартовой структуры для уточнения использовалась модель нуклеазы при разрешении 1.7 Å [12]. Молекулы воды, как правило, являются менее надежно определяемой частью структуры, поэтому все молекулы воды были исключены из стартовой модели и реконструированы на более поздних стадиях исследования независимо в ходе ручной корректировки модели.

Уточнение *Sma*-нуклеазы при разрешении 1.07 Å значительно увеличило достоверность полученной модели и, хотя первый *N*-концевой остаток в каждом из мономеров белка был исключен из моделирования, существенно повысило точность ее геометрических параметров. Прежде всего, набор экспериментальных структурных амплитуд при уточнении геометрии молекулы при разрешении 1.07 Å более чем в три раза превышал аналогичный набор для 1.7 Å-модели. Кроме того,

пространственная структура *Sma*-нуклеазы установлена в анизотропном приближении.

Согласно конечной модели, значения торсионных двугранных углов ϕ и ψ для аминокислотных остатков основной полипептидной цепи *Sma*-нуклеазы попадают в область разрешенных значений, и все неглициновые остатки, за исключением Ala10 и Asn177, находятся в наиболее выгодных либо в допустимых конформациях. Модель отвечает всем стереохимическим требованиям, предъявляемым к структурам высокого разрешения. Остатки Ala10 и Asn177 находятся в конформации γ -поворота, при этом остаток Ala10 содержится в короткой петле Cys-Ala-Val-Gly-Cys, которая стабилизирована дисульфидной связью между остатками цистеина и водородными связями (Cys9)O...N(Val11), (Val11)O...N(Gly221) и (Gly12)O...N(Ala220).

Финальная структура гомодимерной молекулы нуклеазы *Sma* (Brookhaven Protein Data Bank, код 1G8T) содержит 3924 неводородных атома и 715 молекул воды, причем 51 а.о. димера и 131 молекула воды имеют альтернативные конформации в субъединицах. Максимальные значения *B*-факторов молекул воды не превышают 51 Å² и белковых остатков – 31 Å², тогда как их средние значения составляют соответственно 18.4 и 10.0 Å². В активном центре каждой из субъединиц локализован ион магния и ион сульфата, связанный водородной связью с водно-магниевым кластером.

Сравнение полученной и стартовой моделей структур нуклеазы *Sma* подтверждает их высокое качество и показывает отсутствие принципиальных расхождений в этих структурах. В целом топологическая компактизация основной цепи нуклеазы идентична ее фолдингу, описываемому при разрешении структуры 1.7 Å, свидетельствуя о наличии ярко выраженной внутренней симметрии. Трехичная архитектура белка в первом приближении может быть описана тремя основными областями вторичной структуры: центральным β -слоем, состоящим из шести антипараллельных β -цепей, фланкированным α -доменом, образованным четырьмя короткими α -спиралями и связывающим *N*- и *C*-концевые участки молекулы, и α/β -конформационным доменом, формирующим верхний слой глобулы, который содержит двухстрэндный β -лист, обрамленный симметричной системой из восьми спиральных фрагментов (рис. 1). Подобная компактизация несколько отличается от топологии нуклеазы, представленной структурой белка при разрешении 2.1 Å [11]. Предполагаемые различия касаются в основном двух областей полипептидной цепи, в частности, сегмента цепи Asp79–Arg136, образующего верхний слой молекулы, участвующего в связывании субстрата и содержащего активный центр фермента, и *C*-концевого локуса белка Ala198–Gly242, вовлеченного в процесс его структурной димеризации.

Таблица 1. Рентгенодифракционные параметры кристаллов и статистические характеристики уточненной структуры нуклеазы *Sma*

Пространственная группа	$P2_12_12$
Параметры элементарной ячейки (Å):	
<i>a</i>	106.39
<i>b</i>	73.67
<i>c</i>	68.12
Параметр Метьюза (Å ³ /Да)	2.1
Разрешение (Å)	20.0–1.07
Число рабочих рефлексов (использованных при уточнении)	199881
R_{sym} набора	0.041
Стандартный <i>R</i> фактор (%)	12.4
R_{free} (%)	15.3
Среднеквадратичные (rms)/максимальные отклонения от стандартных значений для:	
длин связей (Å)	0.013/0.05
валентных углов (град)	1.4/8.9
торсионных углов (град)	4.5
хиральных объемов (Å ³)	0.113/0.285
Средние/максимальные значения <i>B</i> -факторов (Å ²):	
атомы белка (остатки 6–243)	10.01/30.81
молекулы воды	18.44/50.67
Значения <i>B</i> -факторов для ионов Mg ²⁺ в <i>A(B)</i> молекуле (Å ²)	7.11 (4.64)
Среднее значение <i>B</i> -фактора для остатков 5, 244 и 245	28.14
Статистика распределения углов ϕ , ψ а.о. на карте Рамачандрана (%):	
в разрешенных областях	91.2
в дополнительных областях	7.8
в запрещенных областях	1
Число остатков в модели	2 × 242
Число неводородных атомов в модели	3924
Число остатков с двойными положениями боковых групп	51
Число молекул воды, включенных в модель	715
Число молекул воды с двойными положениями	131
Число ионов Mg ²⁺	2

В предложенной ранее интерпретации полипептидная цепь 49–136 рассматривалась как длинная неупорядоченная петля, переходящая в искривленную спираль Lys115–Asp135 [11]. Однако, согласно настоящим данным, визуальный анализ пространственного строения молекулы, анализ распределения значений торсионных углов ϕ и ψ и системы водородных связей показывают, что этот участок обладает достаточно жесткой конформацией, позволяя подтвердить наличие в нем дополнительных элементов вторичной структуры, выявленных ранее при описании структуры белка при разрешении 1.7 Å [12].

Следует отметить, что полипептидная цепь в сегменте 73–135 расположена практически в одной

плоскости, тогда как участок петли Thr50–Lys60 находится в конформации, близкой к вытянутой, образуя дугу, расположенную перпендикулярно этой плоскости, и, обладая из-за отсутствия стабилизирующих водородных связей большей конформационной свободой, может претерпевать структурные изменения в процессе связывания ферментом ионов металла или субстрата. В свою очередь настоящий анализ атомной структуры нуклеазы свидетельствует о корректности выделения отсутствующей в предыдущей схеме [11] дополнительной короткой спирали h5 (Phe200–Arg204 [12]) в C-концевом субдомене 198–242 молекулы, комплементарной спиральному фрагменту h8 (Leu237–Met241), что подчеркивает ло-

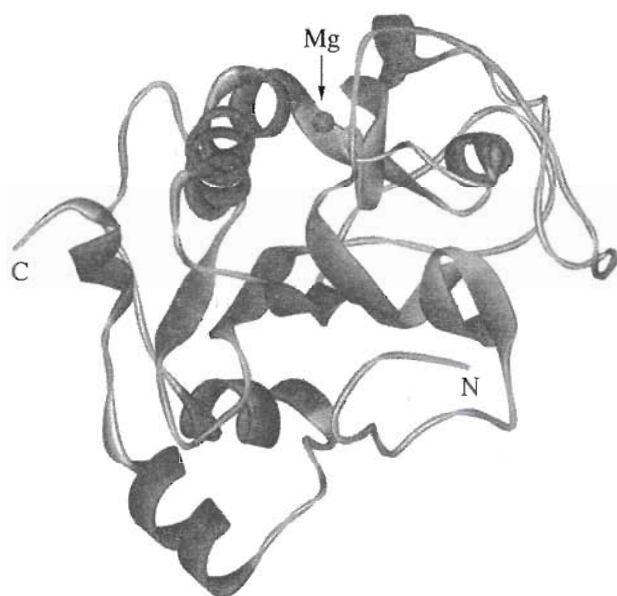


Рис. 1. Топология вторичной структуры в мономере нуклеазы *Sma*. Показано положение иона магния.

кальную симметрию топологии фермента в этом участке белковой глобулы.

Среднеквадратичные (rms) отклонения в координатах атомов основной цепи и боковых групп аминокислотных остатков при сопоставлении двух моделей составляют 0.24 и 0.47 Å. Максимальные отклонения наблюдались в наружных петлях, экспонированных в растворитель, и сопровождалась относительно высокими значениями температурных факторов. Примерно такие же различия были обнаружены и при сравнении двух независимо уточнявшихся молекул, находящихся в независимой части кристаллической ячейки – среднеквадратичные отклонения в координатах атомов молекул, связанных некристаллографической симметрией, составляют для атомов основной и боковых цепей двух субъединиц значения 0.41 и 0.54 Å. Как отмечалось ранее, и в этом случае большинство атомов с максимальными отклонениями в координатах (~3 Å) локализованы в боковых группах остатков аминокислот, расположенных на поверхности белковой глобулы. Средние величины температурных



Рис. 2. Стереобразное изображение структуры димерной молекулы нуклеазы *Sma*. Показаны C^{α} -атомы полипептидных цепей (на изломах линий; мономер *A* – толстые линии, мономер *B* – тонкие линии) и Mg^{2+} -ион (темный кружок).

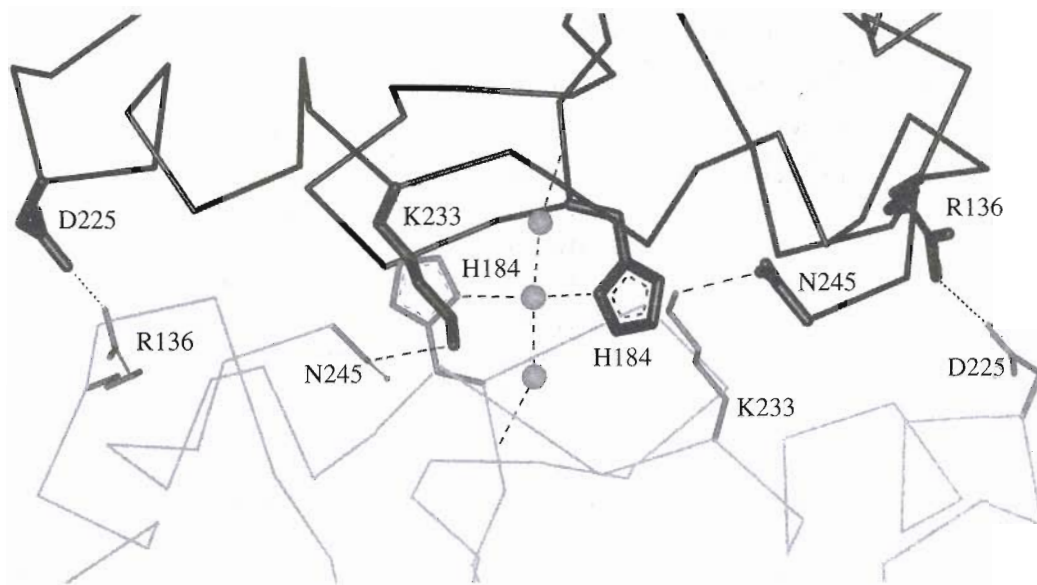


Рис. 3. Фрагмент межмолекулярных контактов субъединиц нуклеазы *Sma*. Кружками показаны молекулы воды; водородные и солевые связи представлены соответственно штриховыми и пунктирными линиями; аминокислотные остатки – в однобуквенном коде.

факторов для атомов остова полипептидной цепи белка и боковых групп аминокислотных остатков составляли значения 9.9 и 12.2 Å² соответственно.

Фермент представляет собой компактную глобулу размером ~30 × 35 × 45 Å. Плотность упаковки характеризуется значением параметра Метьюза, равным 2.1 Å³/Да. Формирование димерной структуры нуклеазы (рис. 2) обеспечивается множественным участием поверхностных групп белка, включающих фрагмент Leu237-Pro-Glu-Leu-Met241 (спираль h8 C-концевого домена, имеющая приближенную к 3₁₀-типу конформацию), α-спиральный фрагмент h7 (Asp224-Asp-Val-Gln-Ala-Ser-Leu230) и остатки двух полипептидных петель центрального домена – Asn177-Asn-Ser-Pro-Ala-Val-Asn-His184 и Arg136-Ala-Asp-Ile-Ser140 [12]. Первая из этих петель связывает комплементарные β-цепи s7 и s8 и содержит важный для субъединичных взаимодействий остаток His184 [4, 14, 15], а вторая расположена между короткой спиралью 3₁₀-типа h4c и β-цепью s6 [12]. Спираль h8 одного из мономеров нуклеазы взаимодействует со спиралью h7 другого мономера (рис. 2). Остаток His184 в каждой из субъединиц связан сеткой водородных связей и межатомными взаимодействиями. Так, атомы азота и карбонильный кислород основной цепи остатков His184 и Val182, как и N^{ε2}-атомы His184 и атомы кислорода основной цепи Pro180 и Ala181, образуют межмолекулярные водородные связи, а C^{ε1}-атом His184 и атомы кислорода Pro189 и Asn183, а также N^{ε2}- и C^{δ2}-атомы His184 и C- и O-атомы Ala181 соответственно находятся на вандер-ваальсовых расстояниях (<3.5 Å), участвуя в неполярных белок-белковых контактах мономеров. В то же время три молекулы воды принима-

ют участие в опосредованном взаимодействии остатков His184, N^{ε5}-атом близкорасположенного Lys233 одной из субъединиц связан водородной связью с атомом кислорода основной цепи Asn245 другой, а O^{δ2}-атом Asp255 A-мономера образует солевую связь соответственно с N^{η1}-атомом B-мономера Arg136 (расстояния между атомами составляют 2.77 Å, рис. 3). Поскольку нуклеолитиче-

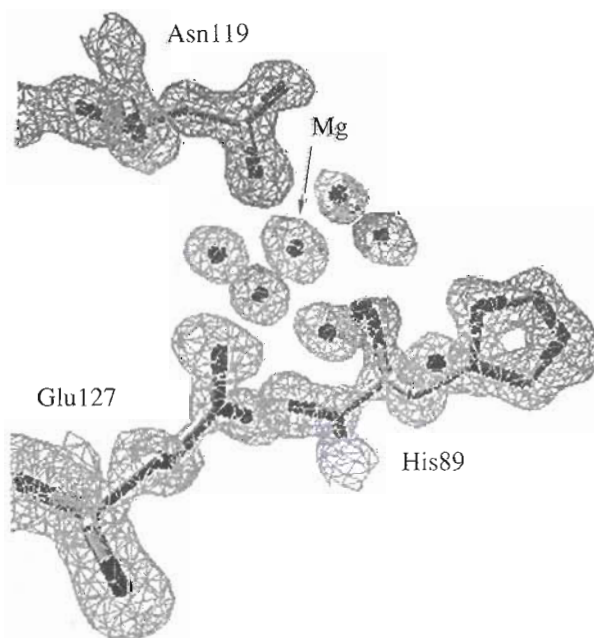


Рис. 4. Фрагмент (2F_o-F_c)-карт электронной плотности водно-магниевого кластера и остатков активного центра нуклеазы *Sma*.

Таблица 2. Геометрические параметры активного центра A(B)-субъединиц нуклеазы *Sma*

Межатомные расстояния (Å) и значения температурных факторов (Å ²)				
Атом 1	B-фактор	Атом 2	B-фактор	Расстояние
Mg ²⁺	7.08 (4.60)	O ^{δ1} (Asn119)	14.34 (11.09)	2.07 (2.01)
»		O (H ₂ O a)	8.38 (9.44)	2.11 (2.11)
»		O (H ₂ O b)	13.12 (9.82)	2.06 (2.06)
»		O (H ₂ O c)	9.87 (13.66)	2.08 (2.13)
»		O (H ₂ O d)	13.17 (9.81)	2.02 (2.04)
»		O (H ₂ O e)	11.18 (8.75)	2.08 (2.06)
N (His89)	8.07 (7.35)	O (H ₂ O a)		2.97 (2.95)
N (His89)		O (H ₂ O e)		3.10 (3.17)
N ^{δ1} (His89)	9.64 (8.25)	O (H ₂ O a)		2.73 (2.72)
N ^{ε2} (His89)	10.37 (8.83)	O ^{δ1} (Asn106)	10.05 (9.03)	2.78 (2.81)
O (His89)	8.02 (7.65)	O (H ₂ O e)		2.92 (2.87)
O (Asn119)	10.96 (10.83)	O (H ₂ O d)		2.90 (2.82)
O ^{δ1} (Asn119)		O (H ₂ O a)		3.09 (3.05)
O ^{δ1} (Asn119)		O (H ₂ O c)		3.10 (3.10)
O ^{δ1} (Asn86)	13.42 (13.10)	N ^{δ2} (Asn119)	14.76 (11.43)	2.89 (2.83)
N ^{ε2} (Gln114)	8.14 (7.73)	O (H ₂ O e)		2.58 (2.55)
N ^{ε2} (Gln120)	18.93 (17.54)	O ^{δ2} (Asp86)	13.53 (11.98)	2.89 (2.84)
O ^{ε1} (Glu127)	12.74 (10.03)	O (H ₂ O d)		2.70 (2.67)
O ^{ε2} (Glu127)	12.56 (9.49)	O (H ₂ O b)		2.49 (2.59)

Углы O1 (H₂O) – Mg²⁺ – O2 водно-магниевого кластера в субъединицах A и B (град)

O1 (H ₂ O)	O2	A	B
a	O (H ₂ O d)	168.18	168.91
a	O (H ₂ O e)	95.44	95.21
a	O ^{δ1} (Asn119)	95.11	95.34
a	O (H ₂ O b)	87.54	88.88
a	O (H ₂ O c)	81.75	81.98
b	O ^{δ1} (Asn119)	169.29	170.87
b	O (H ₂ O e)	86.91	86.16
b	O (H ₂ O d)	90.42	90.62
b	O (H ₂ O c)	94.04	91.88
c	O (H ₂ O e)	176.98	176.60
c	O ^{δ1} (Asn119)	96.61	96.73
c	O (H ₂ O d)	86.78	86.98
d	O ^{δ1} (Asn119)	89.04	86.79
d	O (H ₂ O e)	96.08	95.80
e	O ^{δ1} (Asn119)	82.52	85.39

ская активность димерного и мономерного вариантов нуклеазы практически не отличимы [4, 15], каталитические центры димерного фермента являются независимыми друг от друга, что не отрицает, конечно, биологической значимости функционирования природного белка именно в димерной форме.

Магнийсвязывающие центры нуклеазы *Sma* расположены на противоположных участках поверхности каждой из субъединиц димерной молекулы белка внутри α/β-конформационного домена, включающего остатки 50–114, и экранированы с одной стороны α-спиральной системой сегментов h4 (остатки 116–135 [12]) и центральным β-слоем с

другой. Mg^{2+} -ион непосредственно контактирует с кислородом $O^{\delta 1}$ остатка Asn119, окружен пятью молекулами воды, координированными в октаэдрической конфигурации (табл. 2), и выполняет таким образом в холоферменте функциональную роль кофактора. Координационные расстояния между молекулами воды и ионом магния составляют значения 2.01–2.11 Å. Температурные факторы для связанного иона магния в субъединицах равны 7.08 и 4.60 Å², а средние температурные факторы для окружающих молекул воды – 11.14 и 10.30 Å² соответственно. Оба центра связывания полностью заселены и четко выявляются на ($2F_o - F_c$)-картах синтеза электронной плотности (рис. 4).

Наряду с водно-магниевым кластером, координированным с Asn119, в активном центре *Sma*-нуклеазы находится по крайней мере семь расположенных поблизости остатков аминокислот – консервативные Arg57, Asp86, His89, Gln114, Glu127 и переменные остатки семейства гомологичных белков [1–4] – Asn106 и Gln120.

Согласно настоящим данным, остаток Asn106 взаимодействует с His89 с образованием водородной связи между карбонильным кислородом Asn106 и $N^{\epsilon 2}$ -атомом His89 (табл. 2, рис. 5). $N^{\epsilon 2}$ -атом Gln120 связан водородной связью с $O^{\delta 2}$ -атомом Asp86, а $O^{\delta 1}$ -атом Asp86 образует водородную связь с боковым радикалом Asn119. Остальные из вышеупомянутых остатков участвуют во взаимодействии с координационно связанными молекулами воды. Так, один из водородных атомов карбоксильной группы Glu127 связан водородной связью с молекулой воды *b*, тогда как другой – с молекулой воды *d*; $O^{\delta 1}$ -атом Asn119, помимо его координации с ионом магния, образует водородную связь с молекулами воды *a* и *c*, а молекула воды *d* взаимодействует с карбонильным кислородом основной цепи Asn119. Молекулы воды *a* и *e* взаимодействуют с амидной группой основной цепи His89, и, кроме того, молекула воды *a* связана водородной связью с $N^{\delta 1}$ -атомом имидазола His89, а молекула воды *e* – с карбонильной группой основной цепи His89. Аналогично водным кластерам дивалентных металлов в кристаллических структурах низкомолекулярных соединений [16], наличие межмолекулярных водородных связей между координационно связанными в *Sma*-нуклеазе молекулами воды представляется маловероятным. Поскольку все остатки, контактирующие с водно-магниевым комплексом инвариантны для всех белков семейства *Sma*-нуклеазы [1–4], можно предположить, что водно-магниевый кластер сам по себе является консервативным элементом структуры ферментов с подобным мотивом строения активного центра. Такая комбинация молекулярных взаимодействий, по-видимому, необходима для связывания и точной фиксации магниевого кофактора, обеспечивая тем самым относи-

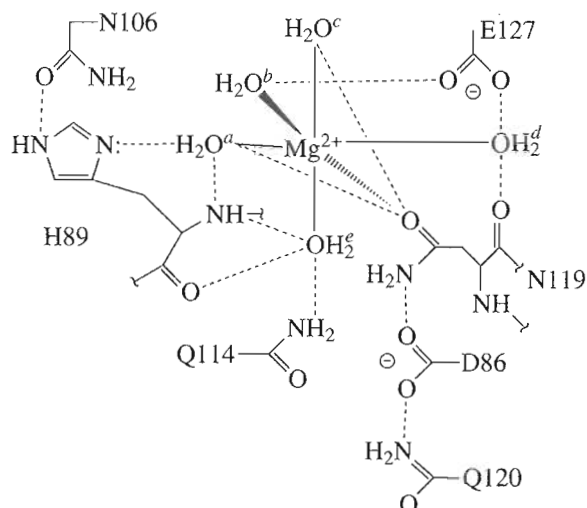


Рис. 5. Нековалентные межатомные взаимодействия в активном центре нуклеазы *Sma*. Сетка водородных и координационных связей представлена пунктирными и непрерывными линиями соответственно, аминокислотные остатки – в однобуквенном коде.

тельную локализацию существенных для катализа аминокислотных остатков белка.

Наблюдаемая в *Sma*-нуклеазе координация иона магния только одной амидной группой аспарагинового остатка является по-своему уникальной, так как Mg^{2+} -ионы обычно координируются карбоксильными группами белков и во всех структурах, где ионы магния хелатируются амидным лигандом, они дополнительно координированы с остатками аспартата или глутамата [16–18]. Нами также предполагалось ранее, что каталитически важный остаток Asp86 *Sma*-нуклеазы принимает участие в хелатировании Mg^{2+} -иона [12]. Настоящие данные, однако, показывают, что этот остаток удален от металлсвязывающего центра на ~7 Å и взаимодействует с Mg^{2+} -кофактором опосредованно, образуя водородные связи с Asn119 и Gln120.

В заключение следует отметить, что хотя ферменты метаболизма нуклеиновых кислот являются, как правило, металл-, и в частности, магниезависимыми, структуры металлсвязывающих центров для большинства из них существенно различаются, варьируя в характере и количестве ионкоординирующих лигандов [16–18]. Вместе с тем информация о структуре магниехелатируемого комплекса, связанного с белком амидной группой аспарагинового остатка, до настоящего времени для сахар- и нуклеотиднеспецифичных нуклеаз ограничена единственным примером нуклеазы *Sma* и, оставаясь, по-видимому, общей для всего родственного семейства белков, отражает завершенность эволюционного процесса структурной адаптации ферментов данного класса, свидетельствуя о функциональной значи-

мости водно-магниевого комплекса в ферментативно регулируемом химическом катализе. Анализ этого вопроса посвящена следующая публикация.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали изоформу нуклеазы *Sma*1, которая, сравнительно с молекулой природного фермента (*Sma*2-форма), не содержала первых трех *N*-концевых аминокислотных остатков [19], при этом нумерацию остатков в первичной структуре исследуемого белка принимали соответствующей таковой для *Sma*2-формы. Выращивание кристаллов для рентгеноструктурного анализа при высоком разрешении проводили методом диффузии паров растворителя из раствора, содержащего 10 мг/мл белка в 10 мМ Трис-НСI-буфере, рН 8.3 в присутствии 10 мМ MgCl₂, используя в качестве осадителя 1.2–1.6 М сульфат аммония [9].

Призматические кристаллы нуклеазы размером 0.7 × 0.3 × 0.2 мм использовали для получения рентгенодифракционного набора интенсивностей на линии BW7B накопительного кольца DORIS/DESY (Гамбург, Германия) с детектором Image Plate (MAR research). Кристаллы помещали в струю азота при температуре 100 К, используя криосистему Oxford Cryostream. В качестве криопротектора использовали 25% глицерин.

Рентгенодифракционные данные обрабатывали с помощью программы DENZO [20]. Уточнение координат атомов кристаллической структуры в анизотропном приближении проводили с помощью программы REFMAC [21], используя набор интенсивностей рентгеновских отражений от кристаллов в области от 20.0 до 1.07 Å. Ручную коррекцию положений уточняемых атомов в электронной плотности проводили на графической станции ESV 10/32 с использованием программы FRODO [22]. Результирующие значения факторов достоверности для всех отражений составляли R 12.4% и R_{free} 15.3%, при этом два *N*- и *C*-концевых остатка аминокислот являлись наименее надежно определяемой частью структуры, имели высокие температурные факторы и, сравнительно с другими участками белка, электронная плотность для концевых сегментов молекулы представлялась не столь ярко выраженной. Проверка стереохимического качества уточненной структуры нуклеазы с использованием программы PROCHECK [23] показала, что по всем контролируемым параметрам модель соответствует разрешенным значениям.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы приносят благодарность В.Ю. Лунину (ИМПБ РАН) за техническую помощь и критические замечания при обсуждении работы.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Meiss G., Gast F.-U., Pingoud A. // J. Mol. Biol. 1999. V. 288. P. 377–390.
2. Benedik M.J., Strych U. // FEMS Microbiol. Lett. 1998. V. 165. P. 1–13.
3. Guynn L.J., Dai W., Benedik M.J. // J. Bacteriol. 1998. V. 180. P. 2262–2264.
4. Meiss G., Gimadudinow O., Haberland B., Pingoud A. // J. Mol. Biol. 2000. V. 297. P. 521–534.
5. Nestle M., Roberts W.K. // J. Biol. Chem. 1969. V. 244. P. 5219–5225.
6. Filimonova M.N., Krause K.L., Benedik M.J. // Biochem. Molec. Biol. Int. 1994. V. 23. P. 1229–1236.
7. Friedhoff P., Meiss G., Kolmes B., Pieper U., Gimadudinow O., Urbanke C., Pingoud A. // Eur. J. Biochem. 1996. V. 241. P. 572–580.
8. Friedhoff P., Kolmes B., Gimadudinow O., Wende W., Krause K., Pingoud A. // Nucl. Acids Res. 1996. V. 24. P. 2632–2639.
9. Банникова Г.Е., Благова Е.В., Варламов В.П., Моргунова Е.Ю., Дементьев А.А., Шляпников С.В. // Биооргани. химия. 1990. Т. 16. С. 1678–1682.
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. 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.
13. Miller M.D., Cai J., Krause K.L. // J. Mol. Biol. 1999. V. 288. P. 975–987.
14. Miller M.D., Krause K.L. // Prot. Sci. 1996. V. 5. P. 24–33.
15. Franke L., Pingoud A. // J. Prot. Chem. 1999. V. 18. P. 137–146.
16. Glusker J.P. // Adv. Prot. Chem. 1991. V. 42. P. 1–76.
17. Cowan J.A. // Chem. Rev. 1998. V. 98. P. 1067–1087.
18. McPhalen C.A., Strynadka N.C.J., James M.N.G. // Adv. Prot. Chem. 1991. V. 42. P. 77–144.
19. Филимонова М.Н., Дементьев А.А., Лецинская И.Б., Бакунина Г.Ю., Шляпников С.В. // Биохимия. 1991. Т. 56. С. 508–520.
20. Otwinowski Z., Minor W. // Methods Enzymol. 1997. V. 276. P. 307–326.
21. Murshudov G., Vagin A., Dodson E. // Acta Cryst. 1997. V. 53. P. 240–255.
22. Jones T.A. // J. Appl. Cryst. 1978. V. 26. P. 268–272.
23. Laskowski R.A., MacArthur M.W., Moss D.C., Thornton J.M. // J. Appl. Cryst. 1993. V. 26. P. 283–291.

X-Ray Analysis of a Magnesium-containing Endonuclease from *Serratia marcescens*

S. V. Shlyapnikov*, V. V. Lunin**, E. V. Blagova**, 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 pr. 59, Moscow, 117333 Russia

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

The three-dimensional crystal structure of the DNA/RNA nonspecific endonuclease from *Serratia marcescens* was refined at the resolution of 1.07 Å to R factor of 12.4% and R_{free} factor of 15.3% using the anisotropic approximation. The structure includes 3924 non-hydrogen atoms, 715 protein-bound water molecules, and a Mg^{2+} ion in each binding site of each subunit of the nuclease homodimeric globular molecule. The 3D topological model of the enzyme was revealed, the inner symmetry of the monomers in its N - and C -termini was found, and the local environment of the magnesium cofactor in the nuclease active site was defined. Mg^{2+} ion was found to be bound to the Asn119 residue and surrounded by five associated water molecules that form an octahedral configuration. The coordination distances for the water molecules and the $\text{O}^{\delta 1}$ atom of Asn119 were shown to be within a range of 2.01–2.11 Å. The thermal factors for the magnesium ion in subunits are 7.08 and 4.60 Å², and the average thermal factors for the surrounding water molecules are 11.14 and 10.30 Å², respectively. The region of the nuclease subunit interactions was localized, and the alternative side chain conformations were defined for 51 amino acid residues of the nuclease dimer. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2001, vol. 27, no. 6; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: atomic structure of holoenzyme, *Serratia marcescens*, extracellular endonuclease, x-ray analysis