



**СТРУКТУРА ХОЛЛИДЕЯ И ПЕРЕКРЕСТ-РАСЩЕПЛЯЮЩИЕ ФЕРМЕНТЫ  
КАК ОСНОВНЫЕ АГЕНТЫ ГОМОЛОГИЧНОЙ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ РЕКОМБИНАЦИИ**

Машков О.И.

Учреждение Российской академии наук Институт биохимии и генетики  
Уфимского научного центра РАН, Уфа, [mmr\\_mashkov@mail.ru](mailto:mmr_mashkov@mail.ru)

**Резюме**

Четырёхнитевой ДНК-перекрест и ферменты, которые его расщепляют, являются главными объектами исследований при изучении молекулярно-биологического аспекта рекомбинации. В данной статье обсуждаются последние данные по геометрическому строению структуры Холлидея, его конформационным состояниям и взаимодействиям со структурно-специфичными резолвазами.

*Ключевые слова:* рекомбинация, структура Холлидея, четырёхнитевой ДНК-перекрест, нуклеаза, эндонуклеаза, резолваза

**Введение**

Генетическая рекомбинация является одним из наиболее важных фундаментальных генетических процессов. Рекомбинация является основой непостоянства генома, это источник новых комбинаций существующих единиц наследственности [Holliday, 1964, 1974]. Она необходима при внедрении вирусной ДНК в геном клетки-хозяина [Subramaniam et al., 2003], поддержании общей стабильности генома [Flores-Rozas, Kolodner, 2000] посредством рекомбинант-зависимой репарации ДНК [Kreuzer, 2004; Smith, 2004], при повторном запуске или расщеплении остановленных репликационных вилок [Cox et al., 2000; Cox, 2001]. Кроме того, без рекомбинации невозможно правильное расхождение гомологичных хромосом во время мейоза [McKim et al., 2002; Morrison et al., 2003; Kreuzer, 2004; McKee, 2004; Sherratt et al., 2004]. Потеря клеткой рекомбинационной активности, вследствие различных вирусных инфекций, ведёт к увеличению числа митотических и мейотических анеуплоидий [MacDonald et al., 1994; Kamstra et al., 1999; Kwan et al., 2003], развитию синдрома ломкой X-хромосомы [Bowater, Wells, 2001; Fleming et al., 2003], раку толстого кишечника [Grady, 2004], преждевременному старению [Lombard et al., 2005; Rodier et al., 2005], снижению стабильности нуклеиновых кислот в качестве носителя наследственной информации.

Изучение процесса рекомбинации осуществляется в двух направлениях. Первое – исследование пространственно-временных особенностей организации свободного ДНК-перекреста (основного промежуточного звена рекомбинационного события) в зависимости от качественного состава буферной системы. Второе – изучение ферментативного аппарата рекомбинации. К этому направлению можно отнести структурно-функциональный анализ кристаллических форм расщепляющих ДНК-перекрест ферментов как в свободном состоянии, так и в комплексе со специфическим субстратом. В настоящей статье последовательно рассматривается как сам механизм прохождения рекомбинации, так и его основные агенты – ДНК-перекрест и ферменты, участвующие в его разрешении.

**Основные положения гомологичной рекомбинации**

Рекомбинационное событие происходит в результате взаимодействия двух молекул ДНК в том месте, где их последовательности отличаются высокой степенью подобия. Первым актом рекомбинации является поочерёдное внесение эндонуклеазой одноцепочечных разрывов фосфодиэфирных связей одной из двух цепей в обоих дуплексах. Следует отметить, что данное событие происходит только с цепями одинаковой направленности (рис. 1.1). После этого между дуплексами в местах разрывов происходит обмен

цепями. Это приводит к образованию четырёхнитевой крестообразной структуры – структуры Холлидея (рис. 1.2), одного из важнейших промежуточных звеньев многих жизненно-важных клеточных процессов, включая гомологичную генетическую рекомбинацию, репарацию и репликацию повреждённых участков ДНК [Dickman et al., 2002; Déclais et al., 2003]. Далее неспаренные основания одного дуплекса гибридизуются с комплементарными основаниями другого. В результате точка перекреста (обмена нитями между двумя молекулами) начинает перемещаться вдоль рекомбинирующих дуплексов – происходит "миграция ветвления" (рис. 1.3). Необходимо отметить, что миграция точки ветвления перекреста происходит только на участке высокой междудуплексной гомологии [Hsieh, Panyutin, 1995]. Этот процесс сопровождается последовательной локальной денатурацией дуплекса с дальнейшей незамедлительной ренатурацией неспаренных оснований на комплементарной цепи гомологичного дуплекса. Таким образом формируется гетеродуплекс. Однако, миграция точки перекреста на протяжённом участке невозможна без соответствующего ферментативного аппарата. Поскольку в силу спиральной формы молекул нуклеиновых кислот, при продвижении в любую

сторону от изначальной точки перекреста, неизбежно будут возникать либо отрицательные, либо положительные сверхвитки на обеих взаимодействующих сторонах. Данное обстоятельство накладывает существенные ограничения как на скорость миграции перекреста, так и на конечное расстояние, которое способен пройти этот комплекс. В разрешении возникающей ситуации принимает участие перекрест-расщепляющие ферменты (junction resolving enzymes) или резолвазы [Lilley, White, 2001]. Через некоторое время, когда гетеродуплекс окончательно сформирован и продвижение точки ветвления невозможно, происходит изомеризация структуры Холлидея [Kerr, Sadowski, 1975; Powling, Knippers, 1976; Tsujimoto, Ogawa, 1978; Lilley, 2000]. Одна из пар дуплексных плеч (на рис. 1.4.1 это нижняя пара) поворачивается на 180° вокруг оси (рис. 1.4.2), после чего с помощью эндонуклеазы вносятся вторичные разрывы с последующим разрешением четырёхнитевого перекреста на отдельные двунитевые цепи-гомологи (рис. 1.5) [Déclais et al., 2003].

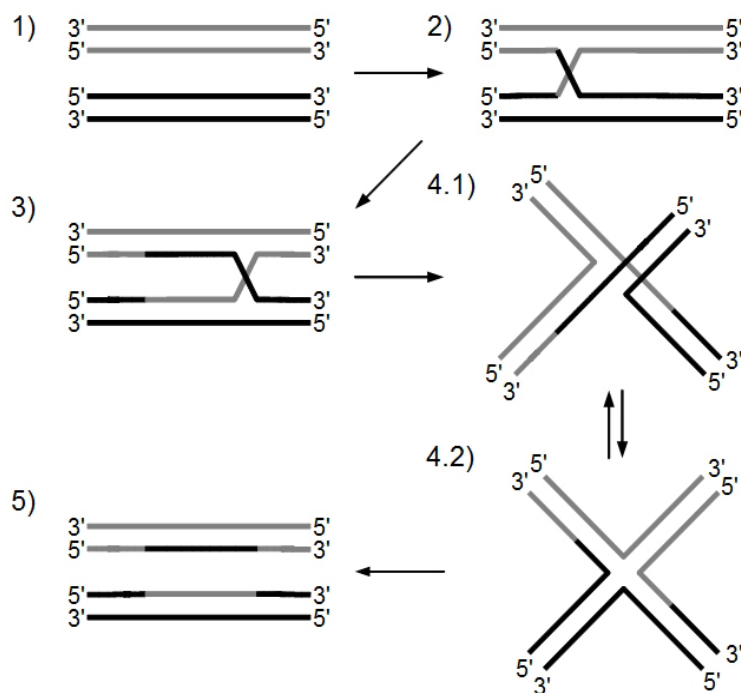


Рис. 1. Схема рекомбинации.

### Особенности строения структуры Холлидея

Принято считать, что в свободном состоянии нити перекреста антипараллельны, поскольку параллельных структур в ДНК-перекресте отмечено

не было [Joo et al., 2004]. Находясь в растворе, четырёхнитевой ДНК-перекрест подвергается конформационным перестройкам на значительном протяжении своей структуры. Так, в случае, когда в



Из сказанного ранее можно заключить, что геометрия четырёхнитевого ДНК-перекреста достаточно прочна и одновременно подвижна. Данное обстоятельство позволяет белкам связываться с ДНК-перекрестом различными способами. Однако необходимо заметить, что многие характеристики свободного ДНК-перекреста сохраняются и в его комплексе с белками. Доказательством этому служит тот факт, что при низких солевых концентрациях и при отсутствии мультивалентных ионов ДНК-перекрест находится в «открытом» состоянии, где практически не происходит одноимённого отталкивания между отрицательно заряженными фосфатными группировками [Duckett et al., 1988]. При добавлении же в раствор мультивалентных катионов или моновалентных ионов в высокой концентрации, перекрест преодолевает электростатическое отталкивание и принимает форму X-подобной структуры (рис. 1.4.1) [Duckett et al., 1988; Murchie et al., 1989].

Несмотря на свой потенциал биологической значимости, определённый биохимический смысл промежуточных форм несвязанного перекреста к данному моменту не выяснен. Исследования при помощи гель-электрофореза и FRET-эффекта наводят на мысль о том, что при отсутствии поливалентных ионов все четыре плеча располагаются в точке перекреста на одной плоскости. Однако неизвестно, существуют ли в физиологических условиях структуры с отличной от описанной ранее геометрией соединения плеч перекреста [Duckett et al., 1988]. Вполне вероятно, что расположение нитей перекреста в двух или трёх плоскостях в точке обмена возможно. Но такое соединение существует слишком короткое для его обнаружения время. Так, к примеру, открытые структуры существуют в физиологических условиях столь недолго, что их изучение возможно только на уровне единичных молекул [Joo et al., 2004]. Изучение открытых перекрестов осложнено ещё и тем, что их невозможно выделить в кристаллической форме. Данный способ анализа пригоден только при исследованиях, связанных с каким-либо агентом четырёхнитевых структур [Ho, Eichman, 2001]. В связи с этим остаётся недостаточно изученным и вопрос описания подробного пути перехода из одного состояния конформера ДНК-перекреста в другое. Для математического описания внутримолекулярных процессов, происходящих в моменты конформерного перехода, используют различные методики моделирования, в том числе метод моделирования молекулярной динамики (МД). Данное обстоятельство обусловлено тем, что

различные описания МД способны объяснить события, которые развиваются в достаточно простых системах, к примеру – в ДНК-белковых комплексах. Структура Холлидея также была хорошо изучена на примере соответствующей модели [von Kitzing et al., 1990; von Kitzing, 1992; Srinivasan, Olson, 1994], однако полученные данные не дают чёткого понимания решения проблемы конформационных изменений.

Конформерный переход ДНК-перекреста из одного состояния в другое происходит в интервале от сотен микросекунд до сотен миллисекунд [Overmars, Altona, 1997; McKinney et al., 2003; Joo et al., 2004]. Это время в тысячи и миллионы раз меньше чем то, которое способен воспроизвести метод МД [Tajkhorshid et al., 2003]. Однако, известно, что при повышении температуры увеличивается и частота конформационных изменений макромолекул (таких как молекулы ДНК, находящихся в состоянии четырёхнитевого ДНК-перекреста). Следовательно, оптимизировав температурный градиент, возможно получить систему, подвергающуюся анализу методом МД [Day et al., 2002].

Обобщая информацию о результатах исследований, основанных на данных молекулярного моделирования, можно заключить [Cooper, Hagerman, 1989; von Kitzing, 1992; Cheatham, Collman, 2000; Ho, Eichman, 2001], что модель четырёхнитевого перекреста получена при условии соосного подвижного соединения взаимодействующих плеч двух молекул ДНК. Такое ограниченное обоюдо-положительное (положительное направление определяется как правое вращение относительно фронтальной стороны перекреста) вращение плеч перекреста было обнаружено при помощи низко-разрешающих методов исследования – методы однонитевого конформационного полиморфизма (single strand conformation polymorphism – SSCP), атомно-силовой микроскопии (atomic force microscopy – AFM) и спектроскопии FRET-эффекта. Междуплексный угол (interduplex angle – IDA) во всех вариантах структуры Холлидея остаётся равным примерно 60° [Duckett et al., 1988].

Изучение одиночных кристаллов методами кристаллографии позволило получить большое количество детальных характеристик структуры ДНК-перекреста [Eichman et al., 2002; Ho, Eichman, 2001; Hays et al., 2003b]. Одним из наиболее интересных аспектов, выявленных в ходе вышеупомянутых исследований, является то, что все изученные кристаллические структуры относятся к перекрестам с инвертированными повторами. Этот мотив может быть сведён к

декануклеотиду  $d(\text{CCNNNPuCPyGG})$ , где Pu – любой пуриновый нуклеотид, Py – цитозин, 5-метилцитозин или 5-бром урацил. Причём, концевые C-G-пары оснований не существенны и могут быть заменены на T-A-пары [Thorpe et al., 2003]. Также установлено, что взаимодействующие молекулы ДНК в структуре Холлидея обмениваются нитями на участке приведённой коровой последовательности между  $N_6$  и  $N_7$  [Haas et al., 2003a].

При сравнении структур одиночных кристаллов было выяснено, что геометрия ДНК-перекреста зависит от атомных взаимодействий вокруг корового тринуклеотида  $\text{Pu}_6\text{C}_7\text{Py}_8$  [Haas et al., 2003a]. Так, к примеру, геометрия структур, полученных с помощью последовательностей  $d(\text{CCGGTACCGG})$  [Eichman et al., 2000; Thorpe et al., 2002] и  $d(\text{CCGGCGCCGG})$  [Haas et al., 2003a], в которых присутствуют прямые водородные связи, взаимодействующие с большой бороздкой перекреста, практически одинаковы. Кроме этого, описанный мотив служит своего рода опорной точкой, вокруг которой уже и выстраивается вся архитектура ДНК-перекреста. Данное утверждение основывается на том факте, что геометрия структуры Холлидея, при связывании одной или нескольких растворяющих молекул с водородными связями корового мотива, становится гораздо более подвижной. Это становится наглядно понятно при введении двух дополнительных геометрических параметров  $\square$   $J_{slide}$  и  $J_{roll}$ , которые описывают последствия для конформации перекреста изменения таких зависимых от последовательности взаимодействий.  $J_{slide}$  характеризует угол отклонения осей взаимодействующих молекул друг относительно друга вдоль всей структуры перекреста.  $J_{roll}$  определяется как угол взаимоотклонения спиралей ДНК относительно горизонтальной оси перекреста.

Междуплексный угол и  $J_{twist}$ . Макроскопия определяет IDA как угол между осями взаимодействующих молекул ДНК относительно геометрического центра перекреста. Данный параметр является одним из основных при исследовании статичных ДНК-перекрестов [Duckett et al., 1988; Clegg et al., 1992; Clegg et al., 1994; Mao et al., 1999; Cooper, Hagerman, 1987; Cooper, Hagerman, 1989]. Сходный параметр  $J_{twist}$  определяется как отношение угла диагоналей плоскости ДНК-перекреста и угла витка спирали, выражаемого в значении угла наклона плоскости пары оснований к плоскости, перпендикулярной оси спирали [Кантор, Шиммель, 1984]. В отличие от IDA, значение  $J_{twist}$  не зависит от длины и может быть определено эмпирически по данным

кристаллографического анализа ДНК-перекреста.  $J_{slide}$  определяется как относительное перемещение взаимодействующих двойных спиралей вдоль их соответствующих осей. Изменение значения  $J_{slide}$  ДНК-перекреста проявляется в виде электростатического возмущения на концах плеч спиралей.  $J_{roll}$  является углом между поперечными центральными осями обеих молекул ДНК, находящихся в структуре Холлидея.

Хотя по топологии моделей кристаллические структуры четырёхнитеного перекреста во многом сходны между собой [Duckett et al., 1988; Murchie et al., 1989; Clegg et al., 1992; Clegg et al., 1994; Cooper, Hagerman, 1987; Cooper, Hagerman, 1989], они заметно отличаются по одному параметру  $\square$  во всех случаях, изученных в последнее время, значение IDA было существенно ниже ( $\sim 41^\circ$ ) по сравнению с данными, полученными в ходе более ранних исследований ( $\sim 60^\circ$ ). Сами авторы новых публикаций признают разброс в значениях IDA. Кроме того, исследования при помощи атомно-силовой микроскопии (АСМ) подтверждают широкий диапазон значений IDA [Mao et al., 1999]. Эти очевидные расхождения во мнениях относительно значения IDA поднимают некоторые вопросы, которые касаются общего характера конформации одиночного кристалла в качестве модели ДНК-перекреста, находящегося в растворе.

Возникают ли эти различия по данным IDA в результате определённых внутримолекулярных взаимодействий, ограничивающих подвижность перекреста? Недавние исследования с использованием АСМ протяжённых плоскостей ДНК-перекреста, которые включают коровый тринуклеотид ACC, дают основания предполагать, что да  $\square$  именно из-за изменения подвижности контактирующих молекул ДНК наблюдается такая существенная разница в получаемых данных по IDA [Sha et al., 2002]. Также выяснено, что коровая последовательность ACC связана с величиной IDA в  $43^\circ$ .

### Обзор структуры ферментов, ответственных за разрешение структуры Холлидея

Поскольку белки, ответственные за селективное разрешение структуры Холлидея – резолвазы, найдены среди широкого круга организмов: у бактериофагов [de Massey et al., 1984], вирусов [Connolly et al., 1991; Iwasaki et al., 1991; Stuart et al., 1992; Garcia et al., 2000], архей [Komori et al., 1999; Kvaratskhelia, White, 2000], эубактерий [Kemper, Garabett, 1981], дрожжей [Symington, Kolodner, 1985; West, Korner, 1985; Whitby, Dixon, 1997; White, Lilley, 1997a; Oram et al., 1998], в клетках млекопитающих и их вирусов [Elborough,

West, 1990; Hyde *et al.*, 1994; Constantinou *et al.*, 2001], можно сделать вывод, что ферменты, осуществляющие этот процесс, есть у всех организмов.

Многие перекрест-расщепляющие ферменты следует отнести к одному из двух суперсемейств белков – интеграз или нуклеаз. В суперсемейство интеграз входят такие резолвазы как RuvC, CseI, Ydc2, а также РНКаза H и фермент вируса коровьей оспы A22. К суперсемейству нуклеаз относятся T7 эндонуклеаза I, резолвазы архей,  $\lambda$ -экзонуклеаза, а также ферменты рестрикции [Lilley, White, 2000; Makarova *et al.*, 2000]. Большинство нуклеаз – сравнительно небольшие основные белки (обычно  $pI_{calc} > 8.5$ ), связывающиеся со структурой Холлидея в строго определённых местах. При этом образуются комплексы димерного белка и ДНК-перекреста, сохраняющие стабильность в присутствии 1000-кратного избытка двухцепочечной ДНК [Duckett *et al.*, 1995; Pöhler *et al.*, 1996; White, Lilley, 1996].

#### Общая молекулярная структура резолваз

Для некоторых перекрест-расщепляющих ферментов методом рентгенструктурной кристаллографии определена молекулярная структура – для RuvC с разрешением 2,5 Å [Ariyoshi *et al.*, 1994], для T4 эндонуклеазы VII и её неактивной мутантной формы с разрешением 2,4 Å и 2,1 Å соответственно [Raaijmakers *et al.*, 1999], для T7 эндонуклеазы I с разрешением 2,1 Å [Hadden *et al.*, 2001]. Помимо этого определены основы строения для Hje *Sulfolobus* [Middleton *et al.*, 2004], Hjc *Pyrococcus* [Nishino *et al.*, 2001] и Ydc2 *S. pombe* [Ceschini *et al.*, 2001]. При этом установлено чёткое подобие особенностей молекулярной организации с ферментами рестрикции у следующих ферментов: эндонуклеазы I бактериофага T7 [Hadden *et al.*, 2001], резолваз архей Hjc [Bond *et al.*, 2001; Nishino *et al.*, 2001], Hje [Middleton *et al.*, 2004] и RecU Грамм-положительных бактерий [McGregor *et al.*, 2005; Kelly *et al.*, 2007]. Однако, если процесс фолдинга отдельных структурных доменов приведённых выше ферментов в большой степени сходен, то их непосредственное пространственное наложение и укладка внутри нативной димерной молекулы приводит к образованию ферментов, существенно различающихся по своей форме и способу взаимодействия со специфическим субстратом [Middleton *et al.*, 2004]. По своей геометрии димерные молекулы перекрест-расщепляющих ферментов приближаются к продолговатому эллипсоиду, на котором расположена ДНК-связывающая поверхность фермента – обширная электроположительная

площадка. В некоторых случаях (T4 эндонуклеаза VII и особенно Ydc2) на ДНК-связывающей поверхности фермента возможно присутствие обширной S-образной плоскости.

#### Молекулярная организация активного центра резолваз

В то время как RuvC, Ydc2, Hjc и RusA проявляют сходство в топологии своих каталитических поверхностей [Rafferty *et al.*, 2003], T4 эндонуклеаза VII [Raaijmakers *et al.*, 1999] и T7 эндонуклеаза I [Hadden *et al.*, 2001] отличаются от большинства резолваз наличием протяжённого функционального домена, образованного в результате слияния двух полипептидов.

Активные сайты перекрест-расщепляющих ферментов были определены при помощи сайт-специфического мутагенеза и кластерного анализа. Во всех случаях изучения резолваз было выявлено наличие (или допущена вероятность нахождения) в структуре активных сайтов бивалентных ионов металлов. Связывание одного иона металла на один активный сайт было показано для T4 эндонуклеазы VII [Raaijmakers *et al.*, 1999], Ydc2 [Ceschini *et al.*, 2001] и RecU [McGregor *et al.*, 2005; Kelly *et al.*, 2007]. В активном сайте T7 эндонуклеазы I в связанном состоянии обнаружено два иона металла [Hadden *et al.*, 2002].

В основном, расстояния между активными сайтами, расположенными на разных субъединицах димерных перекрест-расщепляющих ферментов, можно разделить на две группы. К первой группе относятся ферменты, активные центры которых расположены друг от друга на расстоянии приблизительно 25 Å (T4 эндонуклеаза VII, Hjc и RecU). Ко второй группе – на расстоянии приблизительно 40 Å (T7 эндонуклеаза I, RuvC и Ydc2). Самое незначительное расстояние зафиксировано для RusA – 10 Å [Rafferty *et al.*, 2003]. Такие существенные различия в архитектуре резолваз неизбежно влияют на развитие у них разных способов конформационной укладки связывающегося с ферментом ДНК-перекреста, что в свою очередь приводит к изменению топологии внесения одноцепочечных разрывов в процессе разрешения структуры Холлидея.

Аминокислотные остатки, входящие в состав активного центра, у большинства резолваз принадлежат одному полипептиду. Однако для T7 эндонуклеазы I и RusA характерно формирование смешанного активного центра, состоящего из аминокислотных остатков обеих полипептидных цепей димерного фермента [Déclais *et al.*, 2001].

### **Молекулярная структура комплекса ДНК-перекрест-резолваза**

До недавнего времени была опубликована кристаллическая структура комплекса ДНК-перекреста только с одной резолвазой RusA [Giraud-Panis, Lilley, 1998; Chan et al., 1998]. Мономер данного фермента удерживает перекрест в области малой бороздки одной из нитей ДНК при помощи аргининовой петли, состоящей из четырёх расположенных друг за другом остатков аргинина. К сожалению, из-за высокой реакционной инертности модель взаимодействия димерной формы RusA и ДНК-перекреста до настоящего времени не построена [Macmaster et al., 2006].

В 2007 году получены данные о кристаллической структуре двух резолваз, находящихся в комплексе со специфическим субстратом [Biertümpfel et al., 2007; Hadden et al., 2007]. Благодаря отличной верифицируемости и высокой степени применимости к структурам комплексов других резолваз с ДНК-перекрестом, данные исследования помогли пролить свет на кинетику узнавания перекрест-расщепляющими ферментами структуры Холлидея.

### **Кинетика ассоциации Т4 эндонуклеазы VII со структурой Холлидея**

Процесс узнавания Т4 эндонуклеазой VII структуры Холлидея осуществляется преимущественно на двух реакционных плоскостях, т.е. связывание с ДНК-перекрестом происходит на относительно плоской поверхности. Данный способ взаимодействия Т4Е7 с ДНК очень схож с таковым у резолвазы RuvC [Bennet, West, 1995; Fogg et al., 2001] и ферментами дрожжей Cce1 [White, Lilley, 1997a; White, Lilley, 1997b] и Ydc2 [White, Lilley, 1998].

После узнавания ДНК-перекреста Т4 эндонуклеаза VII при помощи водородных связей и нековалентных взаимодействий трёх обособленных областей ДНК-связывающего домена взаимодействует с малой бороздкой субстрата в открытой Н-подобной конформации. После связывания с ферментом продолжающиеся цепи ДНК почти не отклоняются от геометрического центра перекреста, при этом сохраняется антипараллельность относительно друг друга.

Нековалентные взаимодействия Т4 эндонуклеазы VII и цепей, которые впоследствии подвергаются разрезанию, находятся на расстоянии 2-ой и 7-ой пар оснований от точки обмена цепями двух нитей ДНК. Оставшиеся две цепи контактируют с ферментом в районе 9-ой пары оснований. Взаимодействие фермента с ДНК завершается тремя  $\alpha$ -спиралями, которые

присоединяются к каждому плеча перекреста, содержащему 3'-конец продолжающейся цепи.

### **Кинетика ассоциации Т7 эндонуклеазы I со структурой Холлидея**

В отличие от эндонуклеазы VII бактериофага Т4, Т7 эндонуклеаза I буквально окутывает своими доменами разветвлённую ДНК на достаточно протяжённом участке [Déclais, Lilley, 2007]. При помощи водородных связей и нековалентных взаимодействий Т7ЕI контактирует с ДНК-перекрестом в районе большой бороздки обеих продолжающихся цепей после восьмого нуклеотида. На реакционно-способной поверхности Т7ЕI обнаружены два взаимно-перпендикулярных хемцилиндрических углубления, каждое из которых в длину не превышает  $\sim 30$  Å. Доказано, что плечи ДНК-перекреста связываются с соответствующим каналом на всём своём протяжении. Вследствие этого полагают, что рассматриваемые электроположительные каналы обеспечивают специфическое средство эндонуклеазы I к сравнительно-перпендикулярным ДНК-перекрестам.

Образование ДНК-перекреста не только влечёт за собою характерные структурные изменения в области непосредственного контакта нитей ДНК, но и затрагивает участки рядом с местом разветвления. Исходя из этого, можно предположить, что, как в случае Т4 эндонуклеазы VII, так и в случае Т7 эндонуклеазы I, взаимодействие фермента с субстратом на протяжённом участке необходимо для большей специфичности ферментативной реакции [Hadden et al., 2007].

Связывание Т7ЕI с ДНК-перекрестом приводит к значительному изменению структуры последнего, как глобально, так и локально. Перестройки в архитектуре комплекса прежде всего заключаются в изменении относительной геометрии расположения нитей, которыми цепи ДНК обмениваются в процессе рекомбинации. Так, к примеру, сахарофосфатный остов ДНК может слегка развернуться в месте обмена нитей. Нити, вступающие в обмен, сближаются. Их фосфатные группы подходят друг к другу на расстоянии 6 Å таким образом, что между ними располагается остаток Lys103, необходимый для снижения электростатического отталкивания в центре перекреста. В таком состоянии центральная область комплекса Т7ЕI-перекрест проявляет себя как сверх-открытая структура, где центральные пары оснований на продолжающихся нитях совершенно неспарены. Расстояние между такими нуклеотидами увеличивается до  $\sim 10$  Å.

На данный момент механизмы разрешения структуры Холлидея изучены не полностью. Это

обусловлено тем, что до настоящего времени не получены данные о кристаллической структуре комплекса ДНК-перекреста с присоединённой к нему эндонуклеазой. Можно предположить, что перекрест-расщепляющие ферменты гидролизуют фосфодиэфирные связи, используя молекулу воды, активированную ионами металлов. В пользу этого утверждения свидетельствует тот факт, что среди структур предполагаемых активных центров многих изученных ферментов встречаются кластеры кислых аминокислотных цепей, которые вероятно отвечают за связывание и координацию ионов металлов [Duckett et al., 1995; Saito et al., 1995; Giraud-Panis, Lilley, 1996, 1998; Bolt et al., 1999; Parkinson et al., 1999; Wardleworth et al., 2000]. Кроме того, в активном сайте Т4 эндонуклеазы VII обнаружен ион кальция [Raaijmakers et al., 1999]. Позднее в активном сайте Т7 эндонуклеазы I также были найдены два иона кальция [Hadden et al., 2007].

#### **Характеристика эндонуклеазы I бактериофага Т7**

К хорошо изученным резолвазам относится эндонуклеаза I бактериофага Т7 (Т7ЕI). Этот фермент принадлежит к суперсемейству нуклеаз [Lilley, White, 2000]. Сам белок вовлечён в расщепление хозяйской ДНК, упаковку фаговой ДНК и рекомбинацию во время литического цикла бактериофага Т7 [Studier, 1969]. Основная природная функция Т7ЕI заключается в разрезании структур Холлидея, образующихся при рекомбинации, но благодаря широкой субстратной специфичности данный фермент взаимодействует со множеством разветвлённых форм ДНК, включая линейные гетеродуплексные молекулы с неспаренными нуклеотидами [Mashal et al., 1995].

#### **Молекулярная структура эндонуклеазы I бактериофага Т7**

Фермент Т7ЕI кодируется третьим геном кольцевой молекулы ДНК бактериофага Т7 [Studier, 1969; Center, Richardson, 1970; Sadowski, 1971]. Данный фермент представляет собой небольшой симметричный гомодимер с молекулярной массой 17 kDa, каждый домен которого состоит из 149 аминокислотных остатков. Благодаря своей сильной основности ( $pI_{calc}=9.5$ ) эндонуклеаза I способна неспецифически связываться с ДНК на протяжённых участках, поскольку её мономер проявляет неспецифическую нуклеазную активность [Parkinson, Lilley, 1997]. Однако сильное специфическое взаимодействие со структурой Холлидея (или иными разветвлёнными формами ДНК) происходит только в димерной форме ( $K_d = 2$  nM) [Hadden et al., 2002]. Пограничная область

каждого домена образована аминокислотными остатками, находящимися в положении 17-44 одной субъединицы и 50-145 другой. Момеры соединены  $\beta$ -мостом, который является частью протяжённой  $\beta$ -складчатой структуры ( $\beta$ 2-мост).  $\beta$ 2-Мост состоит из двух протяжённых, тесно прилегающих друг к другу антипараллельных  $\beta$ -складок ( $\beta$ 2).  $\beta$ 2-Мост включает в свой состав небольшую часть пограничной области димера и аминокислотные остатки, взаимодействующие между собой посредством водородных связей. Но следует отметить, что два остатка (Р46 и А47), находящиеся в центре моста, являются исключением из вышесказанного. Они, по-видимому, формируют молекулярный «шарнир» в геометрическом центре белка, что придаёт последнему гибкость.

В каждом домене существует центральная пятискладчатая  $\beta$ -структура, которая вплетается между пятью  $\alpha$ -спиралями. Отличительной особенностью этого комплекса является то, что одна из  $\alpha$ -спиралей ( $\alpha$ 1, включающая аминокислотные остатки 18-29) относится к другой субъединице фермента.

#### **Связывание Т7ЕI со специфическим субстратом**

Эндонуклеаза Т7ЕI кроме структуры Холлидея взаимодействует также и с другими ДНК-структурами, вплоть до гетеродуплексов с одиночными ошибочными спариваниями – мисмэтчами [Mashal et al., 1995]. Несмотря на это, механизм специфического узнавания субстрата до сих пор в деталях не изучен. В случае с ферментами, расщепляющими перекресты, определение молекулярных основ узнавания осложнено изменением конформации ДНК при прикреплении нуклеаз [Bennett, West, 1995; Duckett et al., 1995; Pöhler et al., 1996; White, Lilley, 1997b, 1998; Giraud-Panis, Lilley, 1998; Declais, Lilley, 2000; Fogg et al., 2001]. Такая широкая субстратная специфичность фермента не основывается на возможности Т7ЕI узнавать определённую нуклеотидную последовательность ДНК [White et al., 1997]. Вместо этого эндонуклеазе I бактериофага Т7 необходимо одновременное специфическое по стереогеометрическим характеристикам связывание каждого каталитического домена с разветвлённой ДНК [Guan et al., 2004].

Структура свободной Т7ЕI проявляет большую гибкость при связывании с различными субстратами. При ассоциации с обычным ДНК-перекрестом, который образуется в ходе рекомбинации, субъединицы фермента меняют своё

положение в одной из функциональных плоскостей на 18° относительно друг друга [Hadden et al., 2007].

В случае выбора ферментом в качестве субстрата линейной молекулы ДНК, каталитические домены накладываются друг на друга без возможности образования продуктивного комплекса, поскольку фермент не способен изменять конформацию такой высокостабильной структуры. Однако, при использовании в качестве субстрата «гибкой», лабильной ДНК (например – с ошибочными спариваниями, либо разветвлённой её формы), резолваза для лучшего контакта со своими активными центрами способна локально вносить изменения в их геометрию, вращая нити ДНК вокруг центральной оси фермента. Это позволяет ферменту не только специфически связываться с различными по происхождению субстратами, но и эффективно расщеплять разветвлённую, а, следовательно, и более нестабильную, легко поддающуюся воздействию ДНК. В пользу последнего утверждения можно привести эксперимент по внесению точечных мутаций в сайте  $\beta$ 2-моста, при которых изменялось взаимоположение каталитических доменов Т7ЕI (сами каталитические центры не подвергались генетическим или биохимическим изменениям, приводящим к изменению ферментативного профиля активности Т7ЕI) [Guan et al., 2004]. Такие мутантные формы Т7ЕI обладали существенно ослабленной ферментативной активностью в сравнении с дикой формой фермента.

Для образования комплекса «фермент-субстрат» с Т7 эндонуклеазой I молекула ДНК должна войти в высокоэнергетическое конформационное состояние. Следовательно, из-за высокой энергии активации реакция протекает медленно, но для определённых последовательностей ДНК (например, для дуплексов с несовершенной комплементарной структурой) энергия активации может быть ниже, чем для других. По этой причине ДНК с ошибочно спаренными основаниями или с фосфодиэфирным разрывом в одной из цепей являются для Т7ЕI наиболее предпочтительными субстратами. Такие участки с неполной комплементацией оснований по своей природе более гибкие – они своего рода «горячие точки» неспецифической нуклеазной активности генома.

Формирование продуктивного комплекса между ферментом и субстратом – процесс динамичный. И Т7ЕI, и ДНК-перекрест в течение взаимодействия подвергаются последовательным конформационным изменениям [Duckett et al., 1995; Raaijmakers et al., 2001; Déclais et al., 2003].

### Активный центр Т7 эндонуклеазы I

Активный центр Т7 эндонуклеазы I был выявлен при помощи замен аминокислотных остатков, вовлечённых в координацию двухвалентных ионов металлов. В результате замен преимущественно отрицательно-заряженных аминокислот – Asp и Glu, ферментативная активность Т7ЕI либо существенно снижалась, либо утрачивалась полностью [Déclais et al., 2001; Hadden et al., 2002]. Необходимо отметить, что три аминокислоты (Asp55, Glu65 и Glu20, который относится к  $\alpha$ -спирали другой субъединицы) в нативном ферменте располагаются на небольшом расстоянии друг от друга, а вместе с Lys67, проявляют сильную структурную гомологию по отношению к мотиву каталитической последовательности активного сайта PD55...(D/E65)XK67 многих рестрикционных ферментов II-го типа [Pingoud, Jeltsch, 2001]. Сходный мотив так же найден в последовательности, кодирующей  $\lambda$ -экзонуклеазу [Kovall, Matthews, 1998], MutH [Ban, Yang, 1998], TnsA [Hickman et al., 2000] и перекрест-расщепляющие ферменты архей [Bond et al., 2001; Nishino et al., 2001]. Так, например, C <sup>$\alpha$</sup> - и C <sup>$\beta$</sup> -атомы остатков Glu20, Asp55, Glu65 и Lys67 расположены подобным образом (не превышая среднее квадратичное отклонение 0,33 Å и внутреннее среднее квадратичное отклонение 0,49 Å) у соответствующих аминокислотных остатков, входящих в состав активного центра рестриктазы BglI [Newman et al., 1998].

Приведённые данные могут свидетельствовать о том, что механизм расщепления ДНК-перекреста у перечисленных ферментов сходен. Для осуществления разрешения структуры Холлидея необходимо присутствие в активном центре Т7ЕI двух бивалентных ионов металлов (каждый ион связывается с единственным активным центром одной из субъединиц фермента), соединённых с карбоксильными группами четырёх аминокислотных остатков – Glu20, Asp55, Glu65 и Lys67 [Déclais et al., 2001].

### Заключение

Гомологичная рекомбинация – один из ключевых молекулярно-биологических процессов, обеспечивающих ненаследственную изменчивость генетического материала. Высокая консервативность процесса, выраженная в присутствии у всех известных существующих организмов сходного по организации ферментативного аппарата, а также инвариантности основного промежуточного соединения – структуры Холлидея, позволяет изучать рекомбинацию с

разных эволюционных, биохимических, генетических, молекулярно-биологических, ферментативных точек зрения. Начиная с описания в 1964 г. структуры Холлидея заинтересованность исследовательского сообщества в разрешении вопроса архитектуры и кинетики гомологичной рекомбинации не угасала. Наоборот, можно отметить, что количество работ по данной теме неуклонно росло. Так, к примеру, с меткой «гомологичная рекомбинация» за период с 2000–2011 гг. в базе данных PubMed имеется порядка 10 тысяч опубликованных исследовательских статей. Столь большой массив данных объясняется широким разнообразием и неоднородностью используемого материала. За менее чем полувековое изучение рекомбинации выяснен основной принцип работы ферментного аппарата, а также молекулярное строение субстрата. Однако высокая пластичность в нативных условиях структуры Холлидея при сохранении ею основных предметных характеристик и различная специфичность резолваз не позволяют исследователям оперировать общей молекулярной схемой процесса. Это хорошо видно на примере в расхождении значений IDA в исследованиях последнего десятилетия, а также при выяснении архитектуры комплекса перекрест/резолваза в работах с T7 эндонуклеазой I и с T4 эндонуклеазой VII. Касательно последнего примера можно заключить, что на данный момент известно два способа связывания резолвазы с ДНК-перекрестом. И, следовательно, уместно деление резолваз по принципу их связывания со специфическим субстратом. Конечно, говорить об окончательном закрытии этого вопроса пока преждевременно. Только после накопления достаточно большого для верификации объёма данных, подтверждающих выдвинутое положение о разделении перекрест-специфичных ферментов, можно судить о количестве стратегий разрешения структуры Холлидея.

#### Литература

1. Кантор Ч.Р., Шиммел П.Р. Биофизическая химия: в 3-х т. М.: Мир. 1984. Т. 1. 336 с.
2. Ariyoshi M., Vassilyev D.G., Iwasaki H., Nakamura H., Shinagawa H., Morikawa K. Atomic structure of the RuvC resolvase: a Holliday junction-specific endonuclease from *E. coli* // *Cell*. 1994. V. 78. P. 1063–1072.
3. Ban C., Yang W. Structural basis for MutH activation in *E. coli* mismatch repair and relationship of MutH to restriction endonucleases // *EMBO J.* V. 17. P. 1526–1534.
4. Bennett R.J., West S.C. Structural analysis of the RuvC-Holliday junction complex reveals an unfolded junction // *J. Mol. Biol.* 1995. V. 252. P. 213–226.
5. Biertümpfel C., Yang W., Suck D. Crystal structure of T4 endonuclease VII resolving a Holliday junction // *Nature*. 2007. V. 449(4). P. 616–621.
6. Bolt E.L., Sharples G.J., Lloyd R.G. Identification of three aspartic acid residues essential for catalysis by the RusA Holliday junction resolvase // *J. Mol. Biol.* 1999. V. 286. P. 403–415.
7. Bond C.S., Kvaratskhelia M., Richard D., White M.F., Hunter W.N. Structure of Hjc a Holliday junction resolvase from *Sulfolobus solfataricus* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2001. V. 98. P. 5509–5514.
8. Bowater R.P., Wells R.D. The intrinsically unstable life of DNA triplet repeats associated with human hereditary disorders // *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 2001. V. 66. P. 159–202.
9. Center M.S., Richardson C.C. An endonuclease induced after infection of *Escherichia coli* with bacteriophage T7. I. Purification properties of the enzyme // *J. Biol. Chem.* 1970. V. 245. P. 6285–6291.
10. Ceschini S., Keeley A., McAlister M.S.B., Oram M., Phelan J., Pearl L.H., Tsaneva I.R., Barrett T.E. Crystal structure of the fission yeast mitochondrial Holliday junction resolvase Ydc2 // *EMBO J.* 2001. V. 20. 6601–6611.
11. Chan S.N., Vincent S.D., Lloyd R.G. Recognition and manipulation of branched DNA by the RusA Holliday junction resolvase of *Escherichia coli* // *Nucleic Acids Res.* 1998. V. 26. P. 1560–1566.
12. Cheatham T.E., Kollman P.A. Molecular dynamics simulation of nucleic acids // *Annu. Rev. Phys. Chem.* □ 2000. □ V. 51. P. 435–471.
13. Clegg R.M., Murchie A.I.H., Diekmann S., von Kitzing E., Kemper B., Lilley D.M.J. The solution structure of the four-way DNA junction at low-salt conditions: a fluorescence resonance energy transfer analysis // *Biophys. J.* 1994. V. 66. P. 99–109.
14. Clegg R.M., Murchie A.I.H., Zechel A., Carlberg C., Diekmann S., Lilley D.M.J. Fluorescence resonance energy transfer analysis of the structure of the four-way DNA junction // *Biochemistry.* □ 1992. □ V. 31. □ P. 4846–4856.
15. Connolly B., Parsons C.A., Benson F.E., Dunderdale H.J., Sharples G.J., Lloyd R.G., West S.C. Resolution of Holliday junctions in vitro requires the *Escherichia coli* ruvC gene product // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1991. V. 88. P. 6063–6067.

16. Constantinou A., Davies A.A., West S.C. Branch migration and Holliday junction resolution catalyzed by activities from mammalian cells // *Cell*. 2001. V. 104. P. 259–268.
17. Cooper J.P., Hagerman P.J. Gel electrophoretic analysis of the geometry of a DNA four-way junction // *J. Mol. Biol.* □ 1987. □ V. 198. □ P. 711–719.
18. Cooper J.P., Hagerman P.J. Geometry of a branched DNA structure in solution // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 1989. V. 86. P. 7336–7340.
19. Cox M.M. Recombinational DNA repair of damaged replication forks in *Escherichia coli*: questions // *Annu. Rev. Genet.* 2001. V. 35. P. 53–82.
20. Cox M.M., Goodman M.F., Kreuzer K.N., Sherratt D.J., Sandler S.J., Marians K.J. The importance of repairing stalled replication forks // *Nature*. 2000. V. 404. P. 37–41.
21. Day R., Bennion B.J., Ham S., Daggett V. Increasing temperature accelerates protein unfolding without changing the pathway of unfolding // *J. Mol. Biol.* 2002. V. 322. P. 189–203.
22. Déclais A.-C., Lilley D.M.J. Extensive central disruption of a four-way junction on binding CCE1 resolving enzyme // *J. Mol. Biol.* 2000. V. 296. P. 421–433.
23. Déclais A.-C., Lilley D.M. New insight into the recognition of branched DNA structure by junction-resolving enzymes // *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2007. P. 86–95.
24. Déclais A.-C., Fogg J.M., Freman A.D.J., Coste F., Hadden J.M., Phillips S.E.V., Lilley D.M.J. The complex between a four-way junction DNA and T7 endonuclease I // *EMBO J.* 2003. V. 22. P. 1398–1409.
25. Déclais A.-C., Hadden J.M., Phillips S.E.V., Lilley D.M.J. The active site of the junction-resolving enzyme T7 endonuclease I // *Mol. Biol.* 2001. V. 307. P. 1145–1158.
26. de Massey C., Studier F.W., Dorgai L., Appelbaum F., Weisberg R.A. Enzymes and the sites of genetic recombination: studies with gene-3 endonuclease of phage T7 and with site-affinity mutants of phage X // *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 1984. V. 49. P. 715–726.
27. Dickman M.J., Ingleston S.M., Sedelnikova S.E., Rafferty J.B., Lloyd R.G., Grasby J.A., Hornby D.P. The RuvABC resolvosome // *Eur. J. Biochem.* 2002. V. 269. P. 5492–5501.
28. Duckett D.R., Murchie A.I.H., Diekmann S., von Kitzing E., Kemper B., Lilley D.M.J. The structure of the Holliday junction and its resolution // *Cell*. 1988. V. 55. P. 79–89.
29. Duckett D.R., Panis M.E.G., Lilley D.M.J. Binding of the junction-resolving enzyme bacteriophage T7 endonuclease I to DNA: separation of binding and catalysis by mutation // *J. Mol. Biol.* 1995. V. 246. P. 95–107.
30. Eichman B.F., Ortiz-Lombardia M., Aymami J., Coll M., Ho P.S. The inherent properties of DNA four-way junctions: comparing the crystal structures of holliday junctions // *J. Mol. Biol.* 2002. V. 320. P. 1037–1051.
31. Eichman B.F., Vargason J.M., Mooers B.H.M., Ho P.S. The Holliday junction in an inverted repeat DNA sequence: sequence effects on the structure of four-way junctions // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2000. V. 97. P. 3971–3976.
32. Elborough K.M., West S.C. Resolution of synthetic Holliday junctions in DNA by an endonuclease from calf thymus // *EMBO J.* 1990. V. 9. P. 2931–2936.
33. Fleming K., Riser D.K., Kumari D., Usdin K. Instability of the fragile X syndrome repeat in mice: the effect of age diet and mutations in genes that affect DNA replication recombination and repair proficiency // *Cytogenet. Genome Res.* 2003. V. 100(1–4). P. 140–146.
34. Flores-Rozas H., Kolodner R.D. Links between replication recombination and genome instability in eukaryotes // *Trends Biochem. Sci.* 2000. V. 292. P. 196–200.
35. Fogg J.M., Kvaratskhelia M., White M.F., Lilley D.M.J. Distortion of DNA junctions imposed by the binding of resolving enzymes: a fluorescence study // *J. Mol. Biol.* 2001. V. 313. P. 751–764.
36. Garcia A.D., Aravind L., Koonin E., Moss B. (2000). Bacterial-type DNA Holliday junction resolvases in eukaryotic viruses // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2000. V. 97. P. 8926–8931.
37. Giraud-Panis M.-J.E., Lilley D.M.J. T4 endonuclease VII: importance of a histidine-aspartate cluster within the zinc-binding domain // *J. Biol. Chem.* 1996. V. 271. P. 33148–33155.
38. Giraud-Panis M.-J.E., Lilley D.M.J. Structural recognition distortion by the DNA junction-resolving enzyme RuvA // *J. Mol. Biol.* 1998. V. 278. P. 117–133.
39. Grady W.M. Genomic instability and colon cancer // *Cancer Metastasis Rev.* 2004. V. 23(1–2). P. 11–27.
40. Guan C., Kumar S., Kucera R., Ewel A. Changing the enzymatic activity of T7 endonuclease by mutations at the beta-bridge site: alteration of substrate specificity profile and metal ion requirements by mutation distant from the catalytic domain // *Biochemistry*. 2004. N. 43. P. 4313–4322.

41. Hadden J.M., Convery M.A., Déclais A.-C., Lilley D.M.J., Phillips S.E.V. Crystal structure of the Holliday junction-resolving enzyme T7 endonuclease I at 2.1 Å resolution // *Nat. Struct. Biol.* 2001. V. 8. P. 62–67.
42. Hadden J.M., Déclais A.C., Carr S.B., Lilley D.M.J., Phillips S.E.V. The structural basis of Holliday junction resolution by T7 endonuclease I // *Nature*. 2007. V. 449(4). P. 621–625.
43. Hadden J.M., Déclais A.C., Phillips S.E.V., Lilley D.M.J. Metal ions bound at the active site of the junction-resolving enzyme T7 endonuclease I // *EMBO J.* 2002. V. 21(13) P. 3505–3515.
44. Hays F.A., Vargason J.M., Ho P.S. Effect of sequence on the conformation of DNA Holliday junctions // *Biochemistry*. 2003a. V. 42. P. 9586–9597.
45. Hays F.A., Watson J., Ho P.S. Caution! DNA crossing: crystal structures of Holliday junctions // *J. Biol. Chem.* 2003b. V. 278. P. 49663–49666.
46. Hickman A.B., Li Y., Mathew S.V., May E.W., Craig N.L., Dyda F. Unexpected structural diversity in DNA recombination: the restriction endonuclease connection // *Mol. Cell.* V. 5. P. 1025–1034.
47. Ho P.S., Eichman B.F. The crystal structures of DNA Holliday junctions // *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2001. V. 11. P. 302–308.
48. Holliday R. A mechanism for gene conversion in fungi // *Genet. Res.* 1964. V. 5. P. 282–304.
49. Holliday R. Molecular aspects of genetic exchange and gene conversion // *Genetics*. 1974. V. 78. P. 273–287.
50. Hsieh P., Panyutin I.G. DNA branch migration. In Eckstein F., Lilley D.M.J // *Nucleic Acids and Molecular Biology*. 1995. V. 9. P. 42–65.
51. Hyde H., Davies A.A., Benson F.E., West S.C. Resolution of recombination intermediates by a mammalian activity functionally analogous to *Escherichia coli* RuvC resolvase // *J. Biol. Chem.* 1994. V. 269. P. 5202–5209.
52. Iwasaki H., Takahagi M., Shiba T., Nakata A., Shinagawa H. *Escherichia coli* RuvC protein is an endonuclease that resolves the Holliday structure // *EMBO J.* 1991. V. 10. P. 4381–4389.
53. Joo C., McKinney S.A., Lilley D.M.J., Ha T. Exploring rare conformational species and ionic effects in DNA Holliday junctions using single-molecule spectroscopy // *J. Mol. Biol.* 2004. V. 341. P. 739–751.
54. Kamstra S.A., Kuipers A.G., De Jeu M.J., Ramanna M.S., Jacobsen E. The extent and position of homoeologous recombination in a distant hybrid of *Alstroemeria*: a molecular cytogenetic assessment of first generation backcross progenies // *Chromosoma*. 1999. V. 108(1). P. 52–63.
55. Kelly S.J., Li J., Setlow P., Jedrzejas M.J. Structure flexibility and mechanism of the *Bacillus stearothermophilus* RecU Holliday junction resolvase // *Proteins*. 2007. V. 68. P. 961–971.
56. Kemper B., Garabett M. Studies on T4 head maturation. Purification and characterisation of gene-49-controlled endonuclease // *Eur. J. Biochem.* 1981. V. 115. P. 123–131.
57. Kerr C., Sadowski P. D. The involvement of genes 3, 4, 5 and 6 in genetic recombination in bacteriophage T7 // *Virology*. 1975. V. 65. P. 281–285.
58. Kreuzer K.N. Interplay between DNA replication and recombination in prokaryotes // *Annu. Rev. Microbiol.* 2004. V. 59. P. 43–67.
59. Komori K., Sakae S., Shinagawa H., Morikawa K., Ishino Y.A. Holliday junction resolvase from *Pyrococcus furiosus*: functional similarity to *Escherichia coli* RuvC provides evidence for conserved mechanism of homologous recombination in bacteria eukarya and archaea // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1999. V. 96. P. 8873–8878.
60. Kovall R.A., Matthews B.W. Structural functional and evolutionary relationships between  $\lambda$ -exonuclease and the type II restriction endonucleases // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1998. V. 95(14). P. 7893–7897.
61. Kvaratskhelia M., White M.F. Two Holliday junction resolving enzymes in *Sulfolobus solfataricus* // *J. Mol. Biol.* 2000. V. 297. P. 923–932.
62. Kwan K.Y., Moens P.B., Wang J.C. Infertility and aneuploidy in mice lacking a type IA DNA topoisomerase III beta // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2003. V. 100(5). P. 2526–2531.
63. Lilley D.M.J. Structures of helical junctions in nucleic acids // *Quart. Rev. Biophys.* 2000. V. 33. P. 109–159.
64. Lilley D.M.J., White M.F. Resolving the relationships of resolving enzymes // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2000. V. 97. P. 9351–9353.
65. Lilley D.M.J., White M.F. The junction-resolving enzymes // *Nature Rev. Mol. Cell. Biol.* 2001. V. 2. P. 433–443.
66. Liu J., Déclais A.-C., Lilley D.M.J. Electrostatic interactions and the folding of the four-way DNA junction: analysis by selective methyl phosphonate substitution // *J. Mol. Biol.* 2004. V. 343. P. 851–864.
67. Liu J., Déclais A.-C., McKinney S.A., Ha T., Norman D.G., Lilley D.M.J. Stereospecific effects determine the structure of a four-way DNA junction // *Chem. Biol.* 2005. V. 12. P. 217–228.

68. Lombard D.B., Chua K.F., Mostoslavsky R., Franco S., Gostissa M., Alt F.W. DNA repair genome stability and aging // *Cell*. 2005. V. 120(4). P. 497–512.
69. Macmaster R., Sedelnikova S., Baker P.J., Bolt E.L., Lloyd R.G., Rafferty J.B. RusA Holliday junction resolvase: DNA complex structure — insights into selectivity and specificity // *Nucleic Acids Res.* 2006. V. 34. P. 5577–5584.
70. Makarova K.S., Aravind L., Koonin E.V. Holliday junction resolvases and related nucleases: identification of new families phyletic distribution and evolutionary trajectories // *Nucleic Acids Res.* 2000. V. 28. P. 3417–3432.
71. Mashal R.D., Koontz J., Sklar J. Detection of mutations by cleavage of DNA heteroduplexes with bacteriophage resolvases // *Nat. Genet.* 1995. V. 9. P. 177–183.
72. MacDonald M., Hassold T., Harvey J., Wang L.H., Morton N.E., Jacobs P. The origin of 47 XXY and 47 XXX aneuploidy: heterogeneous mechanisms and role of aberrant recombination // *Hum. Mol. Genet.* 1994. V. 3(8). P. 1365–1371.
73. Mao C., Sun W., Seeman N.C. Designed two-dimensional DNA Holliday junction arrays visualized by atomic force microscopy // *J. Am. Chem. Soc.* □ 1999. □ V. 121. P. 5437–5443.
74. McGregor N., Ayora S., Sedelnikova S., Carrasco B., Alonso J.C., Thaw P., Rafferty J. The structure of *Bacillus subtilis* RecU Holliday junction resolvase and its role in substrate selection and sequence-specific cleavage // *Structure*. 2005. V. 13. P. 1341–1351.
75. McKee B.D. Homologous pairing and chromosome dynamics in meiosis mitosis // *Biochim. Biophys. Acta*. 2004. V. 1677(1–3). P. 165–180.
76. McKim K.S., Jang J.K., Manheim E.A. Meiotic recombination and chromosome segregation in *Drosophila* females // *Annu. Rev. Genet.* 2002. V. 36. P. 205–232.
77. McKinney S.A., Déclais A.-C., Lilley D.M.J., Ha T. Structural dynamics of individual Holliday junctions // *Nat. Struct. Biol.* 2003. V. 10. P. 93–97.
78. Middleton C.L., Parker J.L., Richard D.J., White M.F., Bond C.S. Substrate recognition and catalysis by the Holliday junction resolving enzyme Hje // *Nucl. Acids. Res.* 2004. V. 32. P. 5442–5451.
79. Morrison C., Vagnarelli P., Sonoda E., Takeda S., Earnshaw W.C. Sister chromatid cohesion genome stability in vertebrate cells // *Biochem. Soc. Trans.* 2003. V. 31(1). P. 263–265.
80. Murchie A.I.H., Clegg R.M., von Kitzing E., Duckett D.R., Diekmann S., Lilley D.M.J. Fluorescence energy transfer shows that the fourway DNA junction is a right-handed cross of antiparallel molecules // *Nature*. 1989. V. 341. P. 763–766.
81. Newman M., Lunnen K., Wilson G., Greci J., Schildkraut I., Phillips S.E.V. Crystal structure of restriction endonuclease BglII bound to its interrupted DNA recognition sequence // *EMBO J.* 1998. V. 17. P. 5466–5476.
82. Nishino T., Komori K., Tsuchiya D., Ishino Y., Morikawa K. Crystal structure of the archaeal Holliday junction resolvase Hjc and implications for DNA recognition // *Structure*. 2001. V. 9. P. 197–204.
83. Oram M., Keeley A., Tsaneva I. Holliday junction resolvase in *Schizosaccharomyces pombe* has identical endonuclease activity to the CCE1 homologue YDC2 // *Nucl. Acids Res.* 1998. V. 26. P. 594–601.
84. Overmars F.J.J., Altona C. NMR study of the exchange rate between two stacked conformers of a model Holliday junction // *J. Mol. Biol.* 1997. V. 273. P. 519–524.
85. Panyutin I.G., Hsieh P. The kinetics of spontaneous DNA branch migration // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 1994. V. 91. P. 2021–2025.
86. Parkinson M.J., Lilley D.M.J. The junction-resolving enzyme T7 endonuclease I: quaternary structure and interaction with DNA // *J. Mol. Biol.* 1997. V. 270. P. 169–178.
87. Parkinson M.J., Pöhler J.R.G., Lilley D.M.J. Catalytic and binding mutants of the junction-resolving enzyme endonuclease I of bacteriophage T7: role of acidic residues // *Nucleic Acids Res.* 1999. V. 27. P. 682–689.
88. Pingoud A., Jeltsch A. Structure and function of type II restriction endonucleases // *Nucleic Acids Res.* 2001. V. 29. P. 3705–3727.
89. Powling A., Knippers R. (1976) Recombination of bacteriophage T7 in vivo // *Mol. Gen. Genet.* 1976. V. 149. P. 63–71.
90. Pöhler J.R.C Giraud-Panis M.-J.E. & Lilley D.M.J. T4 endonuclease VII selects and alters the structure of the four-way DNA junction; binding of a resolution-defective mutant enzyme // *J. Mol. Biol.* 1996. V. 260. P. 678–696.
91. Raaijmakers H., Toro I., Birkenbihl R., Kemper B., Suck D. Conformational flexibility in T4 endonuclease VII revealed by crystallography: implications for substrate binding and cleavage // *J. Mol. Biol.* 2001. V. 308. P. 311–323.
92. Raaijmakers H., Vix O., Toro I., Golz S., Kemper B., Suck D. X-ray structure of T4 endonuclease VII: a DNA junction resolvase with a novel fold

- unusual domain-swapped dimer architecture // EMBO J. 1999. V. 18. P. 1447–1458.
93. Rafferty J.B., Bolt E.L., Muranova T.A., Sedelnikova S.E., Leonard P., Pasquo A., Baker P.J., Rice D.W., Sharples G.J., Lloyd R.G. The structure of *Escherichia coli* RusA endonuclease reveals a new Holliday junction DNA binding fold // Structure (Camb). 2003. V. 11. P. 1557–1567.
  94. Rodier F., Kim S.H., Nijjar T., Yaswen P., Campisi J. Cancer and aging: the importance of telomeres in genome maintenance // Int. J. Biochem. Cell. Biol. 2005. V. 37(5). P. 977–990.
  95. Sadowski P. D. Bacteriophage T7 endonuclease. I. Properties of the enzyme purified from T7 phage-infected *Escherichia coli* B // J. Biol. Chem. 1971. V. 246. P. 209–216.
  96. Saito A., Iwasaki H., Ariyoshi M., Morikawa K., Shinagawa H. Identification of four acidic amino acids that constitute the catalytic centre of the RuvC Holliday junction resolvase // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1995. V. 92. P. 7470–7474.
  97. Sha R., Liu F., Seeman N. C. Atomic force microscopic measurement of the interdomain angle in symmetric Holliday junctions // Biochemistry. 2002. V. 41. P. 5950–5955.
  98. Sherratt D.J., Soballe B., Barre F.X., Filipe S., Lau I., Massey T., Yates J. Recombination and chromosome segregation // Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 2004. V. 359(1441). P. 61–69.
  99. Smith K.C. Recombinational DNA repair: the ignored repair systems // Bioessays. 2004. V. 26(12). P. 1322–1326.
  100. Srinivasan A.R., Olson W.K. Computer models of DNA four-way junctions // Biochemistry. 1994. V. 33. P. 9329–9404.
  101. Stuart D., Ellison K., Graham K., McFadden G. *In vitro* resolution of poxvirus replicative intermediates into linear minichromosomes with hairpin termini by a virally induced Holliday junction endonuclease // J. Virol. 1992. V. 66. P. 1551–1563.
  102. Studier F.W. The genetics physiology of bacteriophage T7 // J. Virol. 1969. V. 39. P. 562–574.
  103. Subramaniam S., Tewari A.K., Nunes-Duby S.E., Foster M.P. Dynamics and DNA substrate recognition by the catalytic domain of lambda integrase // J. Mol. Biol. 2003. V. 329(3). P. 423–439.
  104. Symington L., Kolodner R. Partial purification of an endonuclease from *Saccharomyces cerevisiae* that cleaves Holliday junctions // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1985. V. 82. P. 7247–7251.
  105. Tajkhorshid E., Aksimentiev A., Balabin I., Gao M., Isralewitz B., Phillips J.C., Zhu F., Schulten K. Large scale simulation of protein mechanics and function // Adv. Protein Chem. 2003. V. 66. P. 195–247.
  106. Thorpe J.H., Gale B.C., Teixeira S.C., Cardin C.J. Conformational and hydration effects of site-selective sodium calcium and strontium ion binding to the DNA Holliday junction structure d(TCGGTACCGA)<sub>4</sub> // J. Mol. Biol. 2003. V. 327. P. 97–109.
  107. Thorpe J.H., Teixeira S.C., Gale B.C., Cardin, C.J. Structural characterization of a new crystal form of the four-way Holliday junction formed by the DNA sequence d(CCGGTACCGG)<sub>2</sub>: sequence versus lattice? // Acta Crystallogr. D. 2002. V. 58. P. 567–569.
  108. Tsujimoto Y., Ogawa H. Intermediates in genetic recombination of bacteriophage T7 DNA. Biological activity and the roles of gene 3 gene 5 // J. Mol. Biol. 1978. V. 125. P. 255–273.
  109. von Kitzing E., Lilley D.M.J., Diekmann, S. The stereochemistry of a four-way DNA junction: a theoretic study // Nucleic Acids Res. 1990. V. 18. P. 2671–2683.
  110. von Kitzing E. Modeling DNA structures: molecular mechanics and molecular dynamics // Methods Enzymol. 1992. V. 21. P. 449–467.
  111. Voth A.R., Hays F.A., Ho P.S. Directing macromolecular conformation through halogen bonds // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2007. V. 104. P. 6188–6193.
  112. Wardleworth B.N., Kvaratskhelia M., White M.F. Sitedirected mutagenesis of the yeast resolving enzyme Cce1 reveals catalytic residues and relationship with the intron-splicing factor Mrs1 // J. Biol. Chem. 2000. V. 275. P. 23725–23728.
  113. West S.C., Korner A. Cleavage of cruciform DNA structures by an activity from *Saccharomyces cerevisiae* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1985. V. 82. P. 6445–6449.
  114. Whitby M.C., Dixon J. A new Holliday junction resolving enzyme from *Schizosaccharomyces pombe* that is homologous to CCE1 from *Saccharomyces cerevisiae* // J. Mol. Biol. 1997. V. 272. P. 509–522.
  115. White M.F., Lilley D.M.J. Characterization of a Holliday junction resolving enzyme from *Schizosaccharomyces pombe* // Mol. Cell. Biol. 1997a. V. 17. P. 6465–6471.
  116. White M.F., Lilley D.M.J. Interaction of the resolving enzyme YDC2 with the four-way DNA junction // Nucleic Acids Res. 1998. V. 26. P. 5609–5616.
  117. White M.F., Lilley D.M.J. The resolving enzyme CCE1 of yeast opens the structure of the four-way

- DNA junction // J. Mol. Biol. 1997b. V. 266. P. 122–134.
118. White M.F., Lilley D.M.J. The structure-selectivity and sequence-preference of the junction-resolving enzyme CCE1 of *Saccharomyces cerevisiae* // J. Mol. Biol. 1996. V. 257. P. 330–341.
119. White M.F., Giraud-Panis M.-J.E., Pöhler J.R.G., Lilley D.M.J. Recognition and manipulation of branched DNA structure by junction-resolving enzymes // J. Mol. Biol. 1997. V. 269. P. 647–664.

## HOLLIDAY JUNCTION AND JUNCTION-RESOLVING ENZYMES AS THE MAIN AGENTS HOMOLOGOUS GENETIC RECOMBINATION

Mashkov O.I.

Institute of Biochemistry and Genetics of Ufa Science Centre of the Russian Academy of Sciences,  
Russia, Republic of Bashkortostan, Ufa, [mailto:mr\\_mashkov@mail.ru](mailto:mr_mashkov@mail.ru)

### Resume

Four-way DNA junctions and the resolving enzymes are the main objects of research in the study of molecular aspects of recombination. This article discusses recent data about the geometric structure of the Holliday junction, its conformational states and interactions of structural-specific resolvases.

*Keywords: recombination, Holliday junction, four-way DNA junction, nuclease, endonuclease, resolvase.*