

НИКУЮЩИЕ ЭНДОНУКЛЕАЗЫ

©2009 г. Л. А. ЖЕЛЕЗНАЯ¹, Г. С. КАЧАЛОВА^{1,2},
Р. И. АРТЮХ¹, А. К. ЮНУСОВА¹, Т. А. ПЕРЕВЯЗОВА¹,
Н. И. МАТВИЕНКО³

¹ *Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН,
Пушино, Московская область,*

² *Институт Макса Планка, Гамбург, Германия,*

³ *Институт белка РАН, Пушино, Московская область*

I. Введение. II. Стратегии расщепления ДНК по двум цепям эндонуклеазами рестрикции типа II. III. Гетеродимерные эндонуклеазы рестрикции. IV. Никующие эндонуклеазы – субъединицы гетеродимерных эндонуклеаз рестрикции. V. Пространственные структуры субъединиц гетеродимерной эндонуклеазы VspD6I. VI. Искусственные никующие эндонуклеазы. VII. Практическое применение никующих эндонуклеаз. VIII. Заключение.

I. ВВЕДЕНИЕ

Согласно номенклатуре, принятой в 2003 г. [1], к никующим эндонуклеазам отнесены две группы ферментов, вносящих разрыв (nick) только в одну из цепей ДНК. В первую группу входят эндонуклеазы, ассоциированные в клетке исключительно с m5C-ДНК-метилтрансферазами. Они вносят разрыв рядом с неспаренными основаниями G/T пар, возникающими в результате дезаминирования m5-цитозинов внутри последовательности, узнаваемой МТазой. Принадлежность эндонуклеазы к этому типу обозначается символом «V» перед трехбуквенным названием рода бактерии, в которой она присутствует. Например, V.HraII ассоциирована с МТазой HraII в *Haemophilus parainfluenzae*. Символ «V» происходит от названия наиболее изученной никующей эндонуклеазы этого типа Vsr (very short patch repair).

Принятые сокращения: а.о – аминокислотный остаток; МТаза – ДНК-метилтрансфераза; никаза – никующая эндонуклеаза; ОРС – открытая рамка считывания; ПЦР – полимеразная цепная реакция; н.п. – нуклеотидные пары; dNTP – смесь дезоксирибонуклеозидтрифосфатов.

Адрес для корреспонденции: zheleznaya@iteb.ru

Работа выполнена при поддержке РФФИ (гранты № 06-04-48947, 05-04-48901) и наукоград (грант № 04-04-97313).

Настоящий обзор посвящен второй группе никующих эндонуклеаз, которые обозначаются символом «N» перед сокращенным названием рода бактерии. Эти эндонуклеазы, подобно эндонуклеазам рестрикции (рестриктазам), узнают в двухцепочечной ДНК короткую специфическую последовательность и расщепляют ДНК в фиксированном положении относительно узнаваемой последовательности. Но, в отличие от эндонуклеаз рестрикции, никующие эндонуклеазы расщепляют только одну из цепей ДНК. Важно подчеркнуть, что разрыв вносится в predetermined цепь ДНК. В зависимости от того, какую цепь – верхнюю (top) или нижнюю (bottom) расщепляет никующая эндонуклеаза, она обозначается символом Nt или Nb, соответственно (в первых работах использовался только один символ – «N»). Открытие именно такого типа эндонуклеаз послужило основанием для введения нового подтипа эндонуклеаз – «никующие эндонуклеазы».

Первая никующая эндонуклеаза, N.BstSEI, была выделена из штамма *Bacillus stearothermophilus* SE и описана в 1996 г. сотрудниками НПО «Сибэнзим» под названием «никаза» [2]. В дальнейшем изложении мы будем также прибегать к термину «никаза». После довольно длительного периода, в течение которого никаза N.BstSEI оставалась единственным представителем нового типа эндонуклеаз, почти одновременно появилось несколько сообщений о других никующих эндонуклеазах. В 2000 г. о выделении такого же фермента, N.BstNBI, из штамма *B. stearothermophilus* NB сообщили сотрудники фирмы New England Biolabs [3]. В 2001 г. в лаборатории Н.И. Матвиенко из штамма *Bacillus species* D6 была выделена никаза N.BspD6I [4]. В этом же году Дедковым с соавт. [5] была описана никующая эндонуклеаза N.Bst9I, выделенная из штамма *B. stearothermophilus* 9. С этими никующими эндонуклеазами связаны два удивительных факта. Во-первых, несмотря на то что перечисленные эндонуклеазы выделены из разных источников, все они обладают одинаковой специфичностью: узнают в двухцепочечной ДНК последовательность (сайт) 5'-GAGTC-3'/5'-GACTC-3' и расщепляют только цепь, содержащую последовательность 5'-GAGTC, на расстоянии четырех пар нуклеотидов от узнаваемой последовательности в направлении 3'-конца. Однако способность этих никак узнавать одинаковую последовательность имеет простое объяснение. Дело в том, что в отличие от рестриктаз обнаружить никующие эндонуклеазы в лизатах бактериальных клеток достаточно трудно. Наличие эндонуклеаз рестрикции традиционно определяют с помощью электрофореза по образованию фрагментов ДНК после инкубации с лизатом клеток

субстратной ДНК. В качестве субстратных ДНК используют ДНК плазмид и бактериофагов (в частности, бактериофага Т7) с известной нуклеотидной последовательностью. Никазы могут фрагментировать ДНК только в том случае, когда два сайта узнавания в разной ориентации находятся на небольшом расстоянии друг от друга. Именно такое расположение сайтов узнавания четыре раза встречается в ДНК бактериофага Т7. Частая встречаемость такого сочетания сайтов, в свою очередь, объясняется тем, что последовательность GAGTC входит в промоторные последовательности ДНК фага Т7. Второй удивительный факт состоит в том, что секвенирование генов никаз N.BstNBI [6], N.BspD61 [7] и N.BstSEI [8] и прилегающих к ним областей показало, что все последовательности совпадают на 100%. Такое совпадение может быть обусловлено тем, что все исследователи имели дело с одним и тем же широко распространенным штаммом (ферменты выделены в лабораториях, географически удаленных друг от друга). Возможно, однако, что штаммы были все-таки разные, и тогда это указывает на возможный горизонтальный перенос систем рестрикции-модификации, компонентом которых, как будет показано далее, являются никующие эндонуклеазы.

На основании большого сходства никаз с рестриктазами в литературе сложилось представление о том, что никазы являются мутантной формой эндонуклеаз рестрикции, утратившей способность к димеризации и, как следствие, способность к расщеплению ДНК по двум цепям [1, 6]. Нами впервые было показано, что никующие эндонуклеазы являются одной из субъединиц гетеродимерных эндонуклеаз рестрикции [9]. Прежде, чем переходить к изложению этих данных, коротко рассмотрим общую характеристику эндонуклеаз рестрикции типа II.

II. СТРАТЕГИИ РАСЩЕПЛЕНИЯ ДНК ПО ДВУМ ЦЕПЯМ ЭНДОНУКЛЕАЗАМИ РЕСТРИКЦИИ ТИПА II

Эндонуклеазы рестрикции – одно из наиболее многочисленных семейств, насчитывающее около 3900 биохимически охарактеризованных представителей и приблизительно такое же количество, существование которых предсказано на основе биоинформационного анализа последовательностей ДНК, представленных в GenBank. Это чрезвычайно быстро эволюционирующее семейство. Об этом свидетельствует необычайное разнообразие стратегий, используемых эндонуклеазами рестрикции для расщепления ДНК по двум цепям. Эндонуклеазы рестрикции типа II узнают специфические после-

довательности длиной от 4 до 8 н.п. как симметричные, так и несимметричные, и в присутствии ионов Mg^{2+} расщепляют ДНК внутри узнаваемой последовательности или в стороне от этой последовательности, причем как с одной стороны от нее, так и с обеих сторон. Молекулярные массы эндонуклеаз варьируют от ~30 до ~100 кДа. Защиту хозяйской ДНК от автогидролиза обеспечивает парная эндонуклеазе ДНК-метилтрансфераза (МТаза), которая узнает ту же последовательность, что и эндонуклеаза рестрикции, и метилирует по одному основанию (аденин или цитозин) в каждой цепи узнаваемой последовательности. Совокупность двух активностей – эндонуклеазной и ДНК-метилтрансферазной – получила название «система рестрикции-модификации», и рассматривается как последний барьер на пути проникновения чужеродной ДНК в бактериальную клетку.

Несмотря на функциональную общность, разные эндонуклеазы рестрикции используют различные стратегии для расщепления ДНК по двум цепям в зависимости от характера узнаваемой последовательности и наличия у них одного или двух каталитических центров в мономерной молекуле. Так, расщепление палиндромной последовательности, верхняя и нижняя цепи которой одинаковы (например, 5'-GAATTC-3'/5'-GAATTC-3'), обеспечивается димеризацией идентичных мономеров, каждый из которых содержит по одному каталитическому центру. Каждый центр расщепляет «свою» цепь. Согласно рентгеноструктурным данным, димеры взаимодействуют не только с ДНК, но и образуют многочисленные контакты между собой [10]. Образование контактов между димерами служит дополнительным контролем узнавания строго определенной последовательности, так как узнавание неканонической и, следовательно, неметилированной последовательности в хозяйской ДНК приведет к ее гидролизу. По-видимому, именно возникновение этих контактов активирует каталитические центры мономеров. Замена аминокислотного остатка, участвующего в специфическом узнавании основания только в одной субъединице, предотвращает расщепление обеих цепей [11].

В случае, когда эндонуклеазы рестрикции узнают несимметричную последовательность (и, как правило, расщепляют ДНК вне узнаваемой последовательности), задача расщепления ДНК по двум цепям решается по-разному. Так, некоторым эндонуклеазам требуется взаимодействие с двумя копиями узнаваемой последовательности. Наиболее хорошо изучена в этом плане эндонуклеаза рестрикции FokI [12], для которой показано, что расщеплению ДНК по двум цепям предшествует димеризация мономеров, каждый из которых

связан с отдельной копией узнаваемой последовательности. Причем в димеризации участвуют каталитические домены мономеров, и расщепление ДНК по двум цепям происходит только около одного из сайтов узнавания. Примером другого типа расщепления ДНК по двум цепям являются эндонуклеазы рестрикции, содержащие два каталитических центра в мономерной молекуле [13–15], каждый из которых расщепляет «свою» цепь ДНК. И, наконец, уникальной по своему действию является эндонуклеаза *VfiI*. Она взаимодействует с ДНК в виде димера и при димеризации формирует один каталитический центр. Кроме того, она не только не требует в качестве кофактора ионов двухвалентных металлов, но активна даже в присутствии ЭДТА [16, 17].

III. ГЕТЕРОДИМЕРНЫЕ ЭНДОНУКЛЕАЗЫ РЕСТРИКЦИИ

Название «гетеродимерные» получили эндонуклеазы, состоящие из двух разных субъединиц. Этот тип эндонуклеаз мы рассмотрим подробнее в связи с тем, что, как отмечалось выше, никующие эндонуклеазы являются одной из субъединиц гетеродимерных эндонуклеаз рестрикции, обнаруженных сравнительно недавно. Первая такая эндонуклеаза, *Vru10I*, была найдена в штамме *Bacillus pumilus* 10 и описана в 1998 г. [18].

Vru10I узнает в ДНК несимметричную последовательность, но расщепляет симметрично внутри этой последовательности: 5'-CC↓TNAGC/5'-GC↑TNAGG (места расщепления указаны стрелками). Эндонуклеазную активность *Vru10I* авторам удавалось регистрировать только в экстракте клеток, а после хроматографии на первой колонке ни одна из фракций не проявляла эндонуклеазной активности. Причину такого поведения *Vru10I* удалось понять только после того, как был клонирован фрагмент хромосомной ДНК, содержащий эндонуклеазу рестрикции. Этот фрагмент содержал два гена, кодирующих ДНК-метилтрансферазы, и две открытые рамки считывания (ОРС). В экстрактах клеток, содержащих плазмиду с одной или другой ОРС, эндонуклеазная активность отсутствовала. Эта активность регистрировалась только в экстрактах клеток, содержащих плазмиду с обеими ОРС, а также при смешивании экстрактов клеток, содержащих плазмиды с каждой из ОРС по отдельности. Белки, кодируемые каждой из ОРС, были очищены, и только их смесь обладала эндонуклеазной активностью. *Vru10I* стала таким образом первой эндонуклеазой рестрикции, функционирующей в форме гетеродимера, состоящего из субъединиц с молекулярными

массами 34,5 и 34 кДа. Аминокислотные последовательности субъединиц обнаруживают слабую гомологию (25% идентичных а.о. и 17% функционально сходных). Авторам не удалось зарегистрировать комплекса из двух субъединиц, на основании чего они пришли к заключению, что взаимодействие между субъединицами очень слабое.

Вторая гетеродимерная эндонуклеаза – BslII – была найдена в штамме *Bacillus species* [19]. Она узнает симметричную последовательность CCNNNNN↓NNGG/CCNNNNN↑NNGG и расщепляет ДНК симметрично внутри этой последовательности. Несмотря на то, что BslII узнает симметричную последовательность и расщепляет ДНК симметрично внутри сайта, она состоит из двух субъединиц – 26 и 36 кДа, ни одна из которых не связывается с ДНК и не проявляет эндонуклеазной активности. Только их смесь связывается с ДНК и полностью ее гидролизует. В отличие от Vru10I, субъединицы BslII, способны образовывать в растворе в отсутствие ДНК гетеродимеры ($\alpha\beta$), гетеротетрамеры ($\alpha_2\beta_2$) и, возможно, олигомеры. Основываясь на симметрии тетрамера и узнаваемой последовательности (CCN₇GG), авторы высказали предположение, что активной формой BslII является гетеротетрамер, который образуется за счет взаимодействия двух β -субъединиц.

Особенностью BslII является то, что в аминокислотной последовательности α -субъединицы присутствуют два мотива, характерные для цинковых пальцев. Большинство мотивов цинковых пальцев присутствуют в эукариотических факторах транскрипции. BslII – первая бактериальная эндонуклеаза рестрикции, которая содержит мотивы, характерные для цинковых пальцев. Авторы предполагают, что цинк требуется для правильного сворачивания α -субъединицы. Среди гетеродимерных эндонуклеаз рестрикции BslII выделяется высокой термостабильностью – она выдерживает 30 циклов ПЦР.

Следующей гетеродимерной эндонуклеазой стала BbvCI, найденная в штамме *Bacillus brevis* C [20, 21]. BbvCI узнает последовательность, отличающуюся от последовательности, узнаваемой Vru10I, лишь центральной парой нуклеотидов (выделена жирным шрифтом): CC↓TCAGC/GC↑TGAGG. Гидролиз ДНК по двум цепям происходит только в присутствии обеих субъединиц. Так как в последовательности, узнаваемой Vru10I, центральной парой является N/N, следовательно, Vru10I узнает и последовательность, узнаваемую BbvCI. Однако молекулярные массы субъединиц, образующих BbvCI (31 и 32,6 кДа), несколько меньше молекулярных масс субъединиц, образующих Vru10I (34,5 и 34 кДа). Это, по-видимому, связано с тем, что BbvCI в отличие от Vru10I узнает невырожденную центральную пару нуклеотидов.

IV. НИКУЮЩИЕ ЭНДОНУКЛЕАЗЫ – СУБЪЕДИНИЦЫ ГЕТЕРОДИМЕРНЫХ ЭНДОНУКЛЕАЗ РЕСТРИКЦИИ

В геномной ДНК *Bacillus species* D6 к гену никазы прилегает открытая рамка считывания, которая кодирует белок длиной 186 аминокислотных остатков с ранее неизвестной функцией (рис. 1А).

Аминокислотная последовательность, кодируемая ОРС, имеет некоторую гомологию с С-концевой частью никазы – 29% идентичных остатков и 20% гомологичных (рис. 1Б). Когда нами была определена структура никазы N.BspD6I [24] и выявлены а. о., формирующие каталитический центр, стало ясным, что ОРС содержит тот же самый мотив, который формирует каталитический центр никазы. Поэтому можно было ожидать, что продукт ОРС будет обладать эндонуклеазной активностью.

Фрагмент ДНК, содержащий ОРС, был нами клонирован и очищен соответствующий белок, который не связывался с ДНК и не образовывал комплекса с никазой. Однако смесь белка с никазой расщепляла ДНК по двум цепям (рис. 2): верхнюю цепь, как никаза – на расстоянии четырех нуклеотидов от сайта узнавания, а нижнюю – на расстоянии шести нуклеотидов от сайта с некоторым люфтом. Примерно 10% молекул расщепляется на расстоянии пяти нуклеотидов. Наблюдаемый люфт положения, в котором малая

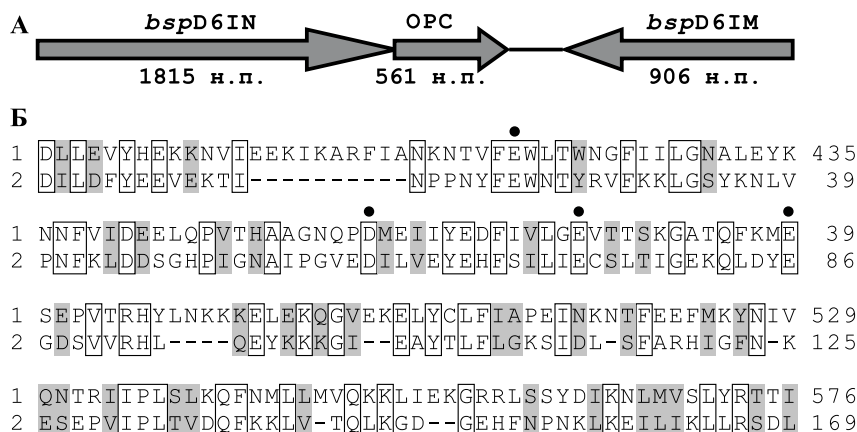


Рис. 1. (А) Организация генного комплекса, содержащего ген никующей эндонуклеазы N.BspD6I.

Размер каждого гена в н.п. указан под стрелками. (Б) Сравнение аминокислотных последовательностей белка, кодируемого N.BspD6I (1) и ОРС (2). Точками указаны аминокислотные остатки, входящие в активный центр никазы.

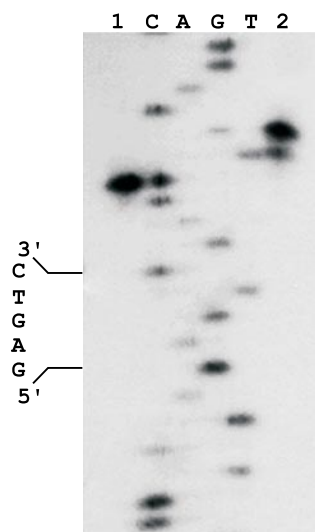


Рис. 2. Локализация фосфодиэфирных связей, гидролизуемых смесью никазы N.BspD61 и малой субъединицы.

С, А, G, Т – продукты реакции секвенирования ДНК фага M13mp19. 1 – меченая ДНК M13mp19, инкубированная со смесью никазы и малой субъединицы; 2 – меченая ДНК M13mp19, инкубированная со смесью никазы и малой субъединицы, к которой после инактивации ферментов добавлены фрагмент Кленова и смесь dNTP. Электрофорез в 6%-ном ПААГ в присутствии 7 М мочевины при 50°C.

субъединица расщепляет нижнюю цепь ДНК, обусловлен, по-видимому, слабым контактом малой субъединицы с никазой и/или с ДНК.

Совокупность полученных данных позволила сделать вывод, что продукт открытой рамки считывания, прилегающей к гену никазы в геномной ДНК *B. species* D6, и никаза являются субъединицами гетеродимерной эндонуклеазы рестрикции. Эта эндонуклеаза получила название BspD6I. Согласно номенклатуре субъединицы этой гетеродимерной эндонуклеазы следует обозначать BspD6IA и BspD6IB. Однако для того, чтобы было проще различать о какой из субъединиц идет речь, большую субъединицу (70,8 кДа) мы будем по-прежнему называть «никующая эндонуклеаза» или «никаза», а продукт ОРС (21,6 кДа) – малой субъединицей.

Эндонуклеаза BspD6I на время ее обнаружения нами в 2006 г. была уникальной гетеродимерной эндонуклеазой рестрикции, одна из субъединиц которой вне комплекса со второй субъединицей проявляет специфическую никующую активность [9]. Отличительные свойства эндонуклеазы рестрикции BspD6I (таблица) позволили отнести ее к новому типу гетеродимерных эндонуклеаз рестрикции, который ранее не был описан в литературе.

Таким образом, нам удалось показать, что никаза N.BspD6I и ее гомологи (N.BstSEI и N.BstNBI), с одной стороны, функционируют как самостоятельные никующие ферменты, а с другой – являются большими субъединицами гетеродимерных эндонуклеаз рестрикции.

Эндонуклеаза рестрикции BspD6I не долго оставалась уникальным ферментом. Вскоре были обнаружены еще две гетеродимерные эндонуклеазы, BsrDI и BtsI, [22], одна из субъединиц которых прояв-

Таблица.
Сравнение свойств гетеродимерных эндонуклеаз рестрикции

Свойства	Эндонуклеазы рестрикции, известные до 2006 г.	Новая гетеродимерная эндонуклеаза рестрикции BspD6I
Молекулярные массы субъединиц	почти одинаковы (~30 кДа)	Сильно различаются (70,8 и 21,6 кДа)
Связывание субъединиц с ДНК	Не связывается и не расщепляет ДНК	Субъединица (70,8 кДа) связывается с ДНК и вносит разрыв в одну цепь ДНК
Расщепление ДНК	Внутри узнаваемой последовательности	В стороне от узнаваемой последовательности

ляет никующую активность. BsrDI выделена из *B. stearotherophilus* D70. Она узнает последовательность GCAATG/CATTGC и расщепляет верхнюю цепь через два нуклеотида от сайта, а нижнюю – сразу за сайтом. BtsI выделена из *Bacillus thermoglucosidasius*. Она узнает сайт GCAGTG/CACTGC и расщепляет ДНК так же, как BsrDI. Обе эндонуклеазы состоят из двух субъединиц: BsrDI – 56 и 25 кДа и BtsI – 38 и 18 кДа, причем каждая из них содержит по одному каталитическому центру. Большие субъединицы обеих эндонуклеаз в отсутствие малых субъединиц действуют как никазы. Сравнение эндонуклеаз BspD6I, BsrD6I и BtsI наглядно демонстрирует многообразие гетеродимерных эндонуклеаз рестрикции. Несмотря на «внешнее» сходство, проявляющееся в том, что одна из субъединиц проявляет никующую активность, молекулярные массы больших субъединиц сильно различаются – 70 кДа (BspD6I), 56 кДа (BsrDI), 38 кДа (BtsI). При этом молекулярные массы малых субъединиц близки (около 20 кДа). Таким образом, в процессе эволюции изменению подвергаются большие субъединицы, по-видимому, в сторону компактизации – уменьшения молекулярной массы.

V. ПРОСТРАНСТВЕННЫЕ СТРУКТУРЫ СУБЕДИНИЦ ГЕТЕРОДИМЕРНОЙ ЭНДОНУЛЕАЗЫ РЕСТРИКЦИИ BSPD61

Нам удалось получить кристаллы нуклеазы N.BspD61 и определить ее пространственную структуру с высоким разрешением (1.8 Å) [23, 24]. Полноразмерная молекула (604 а.о.) представляет собой компактную глобулу продолговатой формы с размерами 50×60×80 Å. Структура состоит из трех доменов (рис. 3): N-концевого (а.о. – 302), линкерного (303–380) и С-концевого (381–604). N-концевой домен состоит из двух субдоменов. Укладка обоих субдоменов представляет собой сильно искаженную версию мотива «спираль-поворот-спираль». С-концевой домен имеет α/β -укладку, сходную с общим коровым мотивом эндонуклеаз рестрикции типа II. Линкерный домен, соединяющий N- и С-концевые домены, представлен α -спиральным пучком, состоящим из трех спиралей. Структура во многом сходна со структурой эндонуклеазы рестрикции FokI, которая, как и нуклеаза N.BspD61, расщепляет ДНК в стороне от сайта узнавания. У FokI N-концевая часть отвечает за узнавание и связывание ДНК, а С-концевая несет каталитическую функцию [25].

Структура FokI была определена в комплексе с ДНК (PDB код: 1fok), в котором субдомены D1 и D2 взаимодействуют с узнаваемой последовательностью. На основании высокой степени структурного сходства субдоменов D1 и D2 нуклеазы с аналогичными доменами FokI был сделан вывод, что N-концевой домен нуклеазы N.BspD61 также является узнающим доменом.

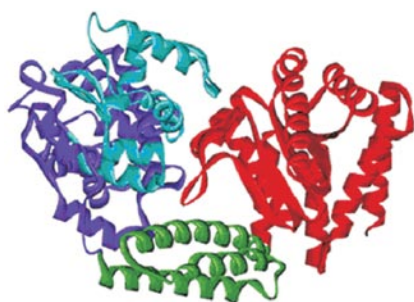


Рис. 3. Структура нуклеазы N.BspD61 (PDB код: 1ewf).

Голубым цветом изображен субдомен D1, фиолетовым – субдомен D2 N-концевого домена, красным – каталитический домен, зеленым – линкерный домен.

Для эндонуклеаз рестрикции типа II установлена характерная последовательность аминокислотных остатков, формирующих каталитический центр, мотив PD...(D/E)XK [26, 27]. Этот мотив включает аминокислотные остатки β -шпильки и прилегающих к ней α -спиралей. Высоко консервативная аспарагиновая кислота первой части этой последовательности PD...(D/E)XK включена в N-конец первой короткой β -цепи, которая вместе с нижележащей петлей делает изгиб. Этот изгиб (около 90°) обеспечивает проли-

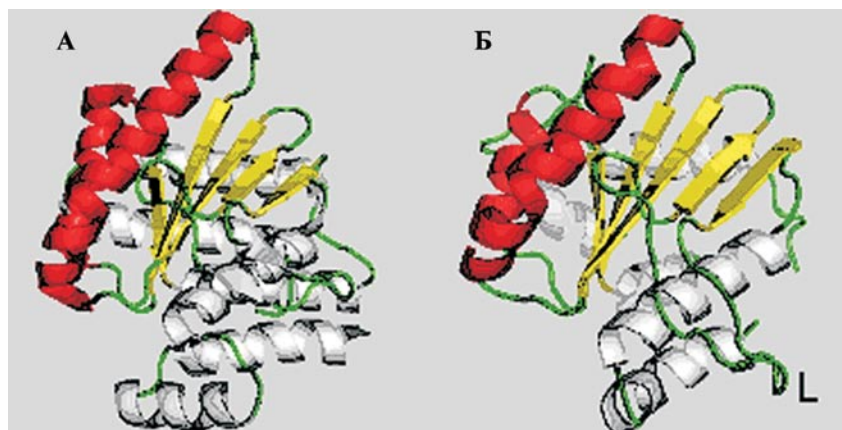


Рис. 4. Пространственные структуры С-концевого домена никующей эндонуклеазы N.BspD6I (А) и малой субъединицы (PDB код: 2P14) (Б).

Желтым цветом обозначены β -спирали, красным – α -спирали, которые, предположительно, участвуют во взаимодействии с ДНК. L – петля в малой субъединице.

новый остаток, предшествующий остатку аспарагиновой кислоты в последовательности полипептидной цепи. Второй кислый остаток в мотиве PD...(D/E)XK лежит в соседней длинной β -цепи. Оставшаяся последовательность мотива представлена аминокислотными остатками XK, где X – гидрофобный остаток, а вместо лизина в качестве последнего элемента каталитического мотива иногда выступают другие положительно заряженные остатки (глутамин, аргинин). Такое специфическое расположение остатков каталитического мотива обеспечивает расщепление фосфодиэфирной связи ДНК. Сходная последовательность, состоящая из остатков P455, D456, E469, V470, E482, была выявлена и в аминокислотной последовательности С-концевого домена N.BspD6I. Основанием для отнесения этих остатков к каталитическому центру являлось, с одной стороны, их взаимное пространственное расположение, а с другой – данные по мутагенезу [6].

Структура малой субъединицы была определена нами с разрешением 1,5 Å [23, 24]. Хотя гомология между аминокислотными последовательностями малой субъединицы и каталитического С-домена никующей эндонуклеазы слабо выражена, их структуры оказались очень сходными (рис. 4). Сходство структур даже при отсутствии гомологии в аминокислотной последовательности типично для эндонуклеаз рестрикции. Структура малой субъединицы, как и

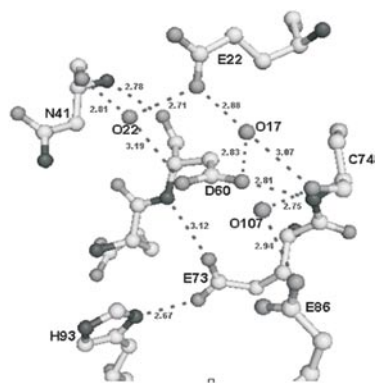


Рис. 5. Структура каталитического центра и его окружения малой субъединицы. Пунктиром обозначены водородные связи.

структура С-домена N.BspD61, представлена β -листом, состоящим из 5 тяжей, окруженного α -спиралями. Примечательно, что в структуре малой субъединицы есть очень протяженная петля (16 а.о.). Петли такой протяженности в С-доме не встречаются. Протяженные петли в структурах гомодимерных эндонуклеаз, как правило, участвуют во взаимодействии между мономерами. Возможно, что эта петля также участвует в формировании контактов с С-домом N.BspD61.

В активном центре малой субъединицы аминокислотные остатки D60, E73 и E86 занимают положение, аналогичное соответствующим а. о. в активном центре никующей эндонуклеазы, что позволило нам отнести их к каталитическому центру малой субъединицы (рис. 5). Особенностью активных центров малой субъединицы и никазы является то, что все три аминокислотных остатка заряжены отрицательно, тогда как в известных эндонуклеазах рестрикции всегда присутствует один положительно заряженный остаток (как правило, лизин). До сих пор известна лишь одна эндонуклеаза, BamHI, которая содержит три отрицательно заряженных остатка в активном центре [28].

VI. ИСКУССТВЕННЫЕ НИКУЮЩИЕ ЭНДОНУКЛЕАЗЫ

Практическая востребованность никующих эндонуклеаз и в то же время ограниченный набор природных ферментов стимулировали интенсивную работу по конструированию искусственных никаз. Первая искусственная никаза, N.MlyI, была получена путем сайто-направленного мутагенеза эндонуклеазы рестрикции MlyI, в результате которого эндонуклеаза MlyI утратила способность к димеризации [6]. Вторая искусственная никаза – N.AlwI – была получена путем замены С-концевого домена эндонуклеазы рестрикции AlwI на С-концевой домен никазы N.BstNBI [30].

Настоящий прорыв в конструировании никующих эндонуклеаз на основе эндонуклеаз рестрикции начался после обнаружения гете-

родимерных эндонуклеаз рестрикции и эндонуклеаз, содержащих два активных центра в мономерной молекуле. Путем инактивации каталитического центра одной из субъединиц гетеродимерных эндонуклеаз *Bru10I* и *BbvCI* были получены никующие эндонуклеазы, гидролизующие только верхнюю или нижнюю цепь ДНК в зависимости от того, какая из субъединиц инактивирована [18, 20]. Аналогичным образом путем инактивации одного из каталитических центров получены никующие эндонуклеазы на основе эндонуклеаз рестрикции, содержащих два каталитических центра в мономерной молекуле – *SapI* [13], *BsaI*, *BsmIA*, *BsmIB* [14]. Перечень никующих эндонуклеаз, приводимый в базе данных REBASE (<http://rebase.neb.com>), состоит в основном из искусственно полученных ферментов.

Оригинальный способ внесения в ДНК одноцепочечного разрыва предложен Франк-Каменецким с соавторами [31, 32]. Они предложили использовать для этой цели пептидный олигонуклеотид (PNA), комплементарный последовательности одной из цепей ДНК в районе одного из сайтов, узнаваемых эндонуклеазой рестрикции (авторы использовали *PleI*). Пептидный олигонуклеотид гибридизуется с соответствующей цепью ДНК, вытесняя вторую, и эндонуклеаза разрезает гибридный сайт по двум цепям. После удаления пептидного олигонуклеотида получается ДНК, расщепленная по одной цепи.

VII. ПРАКТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ НИКУЮЩИХ ЭНДОНУКЛЕАЗ

Как видно из предыдущего раздела, количество никующих эндонуклеаз, различающихся по специфичности, постоянно увеличивается и этот рост не случаен. Эти ферменты становятся новым инструментом молекулярной биологии. Они открыли возможность усовершенствовать или упростить некоторые уже существующие методы, такие как сайт-направленный мутагенез, мечение ДНК, изотермическую амплификацию ДНК с замещением цепи.

Методы изотермической амплификации ДНК с вытеснением цепи в настоящее время широко используются как в фундаментальной науке, так и в прикладных исследованиях: скрининг библиотек, обнаружение точечных мутаций в ДНК, оценка уровня экспрессии мРНК, SNP-анализ геномной ДНК и даже в иммуногистохимии для детектирования поверхностных и внутриклеточных антигенов. Одним из достоинств этого способа амплификации ДНК является то, что реакция проходит при одной температуре, поэтому отпадает

необходимость в приборах, циклично изменяющих температуру реакционной смеси. Во многих случаях в качестве матрицы используется кольцевая ДНК, что обеспечивает так называемую амплификацию по типу катящегося кольца (rolling circle amplification – RCA) [33–35]. При этом синтезируется множество копий этой ДНК, объединенных в конкатомеры.

С помощью никующих эндонуклеаз могут быть преодолены некоторые методические затруднения. ДНК-полимеразам для того, чтобы начать синтез, необходим свободный 3'-ОН конец (затравка). В ряде случаев в качестве затравки используют олигонуклеотид, комплементарный участку последовательности матрицы. Но для того, чтобы он отжегся, необходимо предварительно денатурировать матричную ДНК (если она двухнитевая), что приводит к частичной деградации ДНК. Внесение нисказой разрыва в одну из цепей ДНК позволяет избежать стадии денатурации ДНК.

Никующие эндонуклеазы могут также значительно упростить методы изотермической амплификации ДНК с вытеснением цепи, в частности метод SDA (strand displacement amplification), в котором для получения разрыва в одной цепи ДНК используются тиофосфатные производные ДНК [36]. Полностью модифицированную ДНК эндонуклеазы рестрикции не расщепляют, однако некоторые из них, например HincII, способны вносить разрыв в полумодифицированные сайты, где измененной является только одна из цепей. Соответственно при обработке эндонуклеазой гидролизуется немодифицированная цепь. Однако этот способ не всегда может быть применен (к примеру, при тотальной амплификации геномной ДНК), к тому же он недешев.

Еще одна область, где никующие эндонуклеазы могут заменить традиционные методы – это клонирование ДНК, например ПЦР-фрагментов. Как правило, при клонировании ПЦР-фрагментов в последовательность праймеров закладывают сайты для эндонуклеаз рестрикции. После амплификации ПЦР-продукт и вектор обрабатывают соответствующими эндонуклеазами. При этом образуются выступающие концы 1–4 н.о. длиной. Однако вместо сайтов для эндонуклеаз рестрикции в последовательность праймеров можно заложить сайт для никующей эндонуклеазы, которая расщепляет в стороне от сайта узнавания. В этом случае можно запланировать липкие концы любой длины. Это позволит вообще избежать лигирования и обойтись одной процедурой отжига липких концов вектора и вставки.

Постепенно возрастает число работ, в которых никующие эндонуклеазы применяются на практике. В частности, в работе по изучению процессов рекомбинации и репарации у *E. coli* для получения никированной ДНК и ДНК с одноцепочечными участками была использована никаза Nt.BbvCI [37]. В работе по изучению 7-субъединичного белкового комплекса Ctf18-RFC *Saccharomyces cerevisiae* никазы Nt.BbvCI и Nb.BbvCI использовались для получения никированных плазмид [38].

На основе никующих эндонуклеаз предложены и принципиально новые методы. Принцип одного из них [39] очень простой. Олигонуклеотидный дуплекс, содержащий последовательность, узнаваемую никазой Nt.BstNBI, инкубируется с никазой и ДНК-полимеразой. После расщепления одной из цепей образовавшийся одноцепочечный фрагмент (12 нуклеотидов) уходит в раствор, так как его температура плавления ниже температуры, при которой идет реакция (55 °С). ДНК-полимераза использует появившейся после расщепления свободный 3'ОН-конец и начинает синтез. Но, как только ДНК-полимераза достроит дуплекс, никаза снова вносит разрыв в достроенную цепь. Этот процесс многократно повторяется и таким образом синтезируется большое количество олигонуклеотида длиной 12 нуклеотидов. Поскольку метод довольно чувствителен (удаётся добиться амплификации сигнала более чем в 10⁶ раз), предполагается использовать его для обнаружения малых количеств геномной ДНК, и вообще там, где в настоящее время используется ПЦР в реальном времени.

С использованием никующей эндонуклеазы продемонстрирована возможность перемещать груз (карго), представляющий собой олигонуклеотид [40]. Перемещаемый олигонуклеотид содержит в своем составе последовательность сайта нерасщепляемой никазой цепи. «Рельсы», по которым перемещается карго, представляет собой олигонуклеотид, с которым через небольшие промежутки сгибризованы три олигонуклеотида. В результате из олигонуклеотидов образуется конструкция типа гребенки. Одна половина каждого из трех олигонуклеотидов гребенки комплементарна олигонуклеотиду-рельсу, другая – не комплементарна и содержит в своем составе последовательность сайта расщепляемой никазой цепи. При связывании карго-олигонуклеотида с зубцом такой гребенки никаза расщепляет олигонуклеотид-зубец, отщепленная его часть уходит в раствор, а карго-олигонуклеотид гибридизуется с соседним олигонуклеотидом-зубцом. Для того, чтобы движение началось с первого зубца, последовательность этого зубца подбирается таким

образом, чтобы вероятность сгибридизоваться с ним была выше, чем с другими зубцами. В работе карго-олигонуклеотид содержал на конце тушитель флуоресценции, а второй и третий зубцы – разные флуорофоры. Последовательное тушение флуоресценции подтвердило перемещение карго-олигонуклеотида. Скорость перемещения карго составила 1 Å в секунду. Авторы предполагают, что такой линейный мотор может быть использован для решения некоторых задач нанотехнологий.

Способность никующих эндонуклеаз разрезать только одну из цепей ДНК была использована нами при разработке нового метода детектирования ДНК-мишени в реакции, протекающей при постоянной температуре (55°C) [41, 42]. В реакции участвуют молекулярный бикон и никаза (в работе использована выделенная нами никаза Nt.BspD6I). Молекулярный бикон представляет собой олигонуклеотид, в свободном состоянии имеющий структуру шпильки с петлей. Последовательность петли комплементарна последовательности участка ДНК-мишени. На одном конце олигонуклеотида находится флуорофор, а на другом – тушитель флуоресценции. Благодаря шпильчатой структуре бикона, флуорофор и тушитель флуоресценции находятся в непосредственной близости друг от друга, поэтому флуоресценция флуорофора гасится тушителем флуоресценции. При гибридизации бикона с одноцепочечной ДНК-мишенью происходит разобщение флуорофора и тушителя в пространстве, что ведет к появлению сигнала [43].

Принцип предложенного нами метода состоит в следующем. Петля молекулярного бикона комплементарна ДНК-мишени и содержит последовательность сайта узнавания никазой, GAGTC (расщепляемая никазой цепь), а ДНК-мишень должна содержать последовательность GACTC (нерасщепляемая цепь). Это не сильное ограничение, поскольку такая последовательность встречается достаточно часто – в среднем одна на каждую тысячу н.п. в ДНК случайной последовательности. При гибридизации петли молекулярного бикона с мишенью образуется двуцепочечная ДНК, никаза расщепляет молекулярный бикон, и образуется два одноцепочечных фрагмента. Оба фрагмента отделяются от ДНК-мишени, если температура плавления каждого из них в отдельности ниже температуры, при которой протекает реакция (55°C). Следовательно, в реакции разрезания бикона будет происходить необратимое усиление флуоресценции. Мишень, освобожденная от фрагментов, может принять очередной молекулярный бикон. Таким образом, процесс

гибридизации разрезания может повторяться много раз на одной мишени, обеспечивая накопление сигнала. В отличие от традиционных методов детектирования ДНК-мишеней, где возрастание флуоресцентного сигнала в процессе реакции связано с увеличением количества ДНК-мишени, в этом методе сигнал увеличивается за счет увеличения количества расщепленного молекулярного бикона.

На основе использования никующих эндонуклеаз недавно предложен метод мечения уникальных последовательностей в двухцепочечной ДНК [44]. Метод основан на внесении двух разрывов на расстоянии 15–25 нуклеотидов друг от друга в одной и той же цепи ДНК. Фрагмент, фланкированный разрывами, в реакции вытеснения цепи замещается олигонуклеотидом и лигазой ковалентно «сшивается» с ДНК. Длинный 3'-конец олигонуклеотида не комплементарен ДНК-мишени и представляет собой разветвленную ДНК (3'-flap). Этот конец используется в качестве праймера в реакции амплификации по типу катящегося кольца, и наработанная ДНК регистрируется с помощью флуоресцентного зонда. Предложенный метод может быть использован для детектирования вирусной двухцепочечной ДНК.

Предполагается также, что никующие ферменты могут быть применены для решения некоторых проблем ДНК-нанотехнологий и ДНК-компьютеров [45, 46].

Пока в научных исследованиях и медицинской диагностике никующие эндонуклеазы применяются не очень широко. Это объясняется недостаточным разнообразием этих ферментов и тем, что они стали доступными относительно недавно. Однако интерес к ним постоянно растет. Можно ожидать, что через несколько лет никующие эндонуклеазы получат такое же широкое распространение, какое сейчас имеют полимеразы, эндонуклеазы рестрикции, лигазы и другие ферменты, используемые в молекулярной биологии.

VIII. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Обнаружение нами нового типа гетеродимерной эндонуклеазы пролило свет на происхождение никующих эндонуклеаз, которые ранее рассматривались как природно мутировавшие эндонуклеазы рестрикции, утратившие способность к димеризации и, как следствие, способность к расщеплению ДНК по двум цепям. Обнаружение гетеродимерных эндонуклеаз BtsI и BsrDI [22] со свойствами, сходными со свойствами обнаруженной нами эндонуклеазы BspD6I, свидетельствует о том, что гетеродимерные эндонуклеазы, одна из

субъединиц которых в отсутствие второй субъединицы действует как никующая эндонуклеаза, по-видимому, распространены в природе. Однако зарегистрировать наличие гетеродимерных эндонуклеаз в лизатах бактериальных клеток достаточно трудно.

Традиционно наличие эндонуклеаз рестрикции регистрируют по образованию фрагментов ДНК после инкубации субстратных ДНК с лизатом бактериальных клеток. Незначительное количество найденных гетеродимерных эндонуклеаз рестрикции (6), возможно, связано с особенностями их поведения при выделении. Гетеродимерные эндонуклеазы можно зарегистрировать лишь на стадии инкубации субстратной ДНК с лизатом клеток. Однако при последующей очистке они «теряются». Поэтому исследователи отмечают, что они прекращали дальнейшую работу с такими эндонуклеазами [4, 18, 20]. Так, на начальных стадиях выделения никазы непосредственно из штамма *Bacillus species* D6 мы столкнулись с тем, что с первой колонки, помимо никазы, элюировалась эндонуклеаза рестрикции, которую мы назвали VspD6III [4]. Однако при дальнейшей очистке этой эндонуклеазы с колонки вместо нее элюировалась только никаза. В настоящее время, когда установлено, что в отсутствие ДНК субъединицы не взаимодействуют друг с другом, стала понятна причина, по которой эти эндонуклеазы «теряются» при выделении. Субъединицы при хроматографии выходят в разных пиках и, соответственно, ни в одном из пиков не удается зарегистрировать эндонуклеазной активности (фрагментирования субстратной ДНК).

В заключение рассмотрим организацию генов систем рестрикции-модификации, содержащих гетеродимерные эндонуклеазы рестрикции (рис. 6). В большинстве систем организация сходна. Во-первых, все они, за исключением системы BslII, содержат по два гена ДНК-метилтрансферазы. Наличие двух генов MТаз характерно для систем, которые узнают несимметричную последовательность. Это объясняется тем, что в этом случае последовательности верхней и нижней цепей различаются, поэтому каждую из цепей узнает и метилирует «своя» MТаза. В систему BslII входит одна MТаза, так как система узнает симметричную последовательность. Однако в системах, содержащих две MТазы, гены MТаз по-разному располагаются относительно генов, кодирующих субъединицы, что предполагает разные механизмы регулирования экспрессии генов в разных системах.

Сходство системы обнаруживают и в расположении генов, кодирующих отдельные субъединицы: эти гены ориентированы однонаправленно и почти вплотную прилегают друг к другу. Так, гены

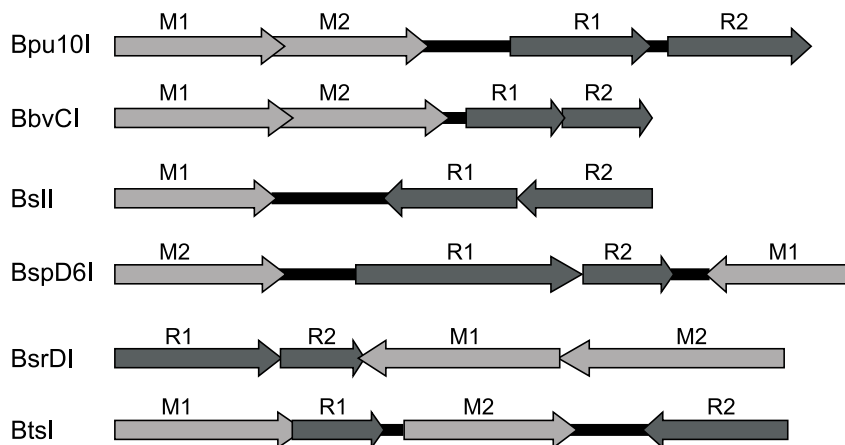


Рис. 6. Организация систем рестрикции-модификации, содержащих гены, кодирующие субъединицы гетеродимерных эндонуклеаз рестрикции.

Темно-серые стрелки с подписью над ними R1 или R2 – гены, кодирующие отдельные субъединицы, светло-серые стрелки с подписью над ними M1 и M2 – гены, кодирующие ДНК-метилтрансферазы.

субъединиц эндонуклеазы Bpu10I отделены друг от друга всего тремя парами нуклеотидов, в системе BspD6I – одним, а в остальных системах они даже перекрываются. В системах BspII и BsrDI последний аденин стоп-кодона TAA одной из субъединиц входит в иницирующий кодон второй субъединицы. В системе BbvCI все гены, включая гены MТаз, перекрываются примерно на 6 нуклеотидов. Такая картина расположения генов субъединиц наводит на мысль, что перед нами стадия эволюции, после которой последует полное слияние генов, кодирующих отдельные субъединицы гетеродимерных эндонуклеаз, и возникнут эндонуклеазы рестрикции с двумя каталитическими центрами.

Возможно, однако, что вектор эволюции совсем другой. Так, в системе BtsI гены, кодирующие отдельные субъединицы, не просто далеко отстоят друг от друга, но разделены геном MТазы. Тогда картину расположения генов субъединиц во всех остальных системах можно интерпретировать совершенно по-другому, а именно: перед нами картина стадии эволюции, не предшествующая слиянию генов субъединиц, а напротив, стадия, предшествующая полному отделению субъединиц друг от друга. Последний вариант эволюции

гетеродимерных эндонуклеаз рестрикции нам представляется более предпочтительным по следующей причине. Внесение разрыва в одну цепь ДНК вовлечено в такие важные клеточные процессы, как репликация, рекомбинация и репарация. Поэтому можно предположить, что в бактериальных клетках на основе систем рестрикции-модификации формируются системы, содержащие только никующую эндонуклеазу.

И, наконец, следует отметить еще один факт: пока все природные никующие эндонуклеазы выделены из бацилл. Исключение составляют лишь две эндонуклеазы, Nt.CviPII и Nt.CvQXI, выделенные из вируса хлореллы NYs-1, которые узнают вырожденный трехнуклеотидный сайт [46, 47]. Вопрос, является ли наличие никующих эндонуклеаз особенностью бацилл, остается пока без ответа.

ЛИТЕРАТУРА

1. Roberts, R.J., Belfort, M., Bestor, T., et al. (2003) *Nucleic Acids Res.*, **31**, 1805–1812.
2. Абдурашитов М.А., Беличенко О.А., Шевченко А.В., Дегтярев С.Х. (1996) *Мол. биол.*, **30**, 1261–1267.
3. Morgan, R.D., Calvet, C., Demeter, M., Agra, R. and Kong, H. (2000) *Biol. Chem.*, **381**, 1123–1125.
4. Железная Л.А., Перевязова Т.А., Альжанова Д.В., Матвиенко Н.И. (2001) *Биохимия*, **66**, 1215–1220.
5. Дедков В.С., Абдурашитов М.А., Янковский Н.К., Килева Е.В., Мякишева Т.В., Попинченко Д.В., Беличенко, Дегтярев, С.Х. (2001) *Биотехнология*, **4**, 3–8.
6. Higgins, L.S., Besnier, C., Kong, H. (2001) *Nucleic Acids Res.*, **29**, 2492–2501.
7. Перевязова Т.А., Рогулин Е.А., Железная Л.А., Матвиенко Н.И. (2003) *Биохимия*, **68**, 1203–1207.
8. Гололобова Н.С., Охалкина С.С., Абдурашитов М.А., Дегтярев С.Х. (2005) *Мол. биол.*, **39**, 960–964.
9. Юнусова А.Л., Рогулин Е.А., Артюх Р.И., Железная Л.А., Матвиенко Н.И. (2006) *Биохимия*, **71**, 1002–1005.
10. Stahl, F., Wende, W., Wenz, C., Jeltsch, A., Pigoud, A. (1998) *Biochemistry*, **37**, 5682–5688.
11. Pingoud, A., and Jeltsch, A. (2001) *Nucl. Acids Res.*, **29**, 3705–3727.
12. Vanamee, E.S., Santagata, S., Aggarwal, A.K. (2001) *J. Mol. Biol.*, **309**, 69–78.
13. Samuelson, J.C., Zhu, Z. Xu, S. (2004) *Nucl. Acids Res.*, **32**, 3661–3671.
14. Zhu, Z., Samuelson J.C., Zhou, J., Dore, A. and Xu, S-Y. (2004) *J. Mol. Biol.*, **237**, 573–583.
15. Armalyte, E., Bujnicki, J.M., Gledriene, J., Gasiunas, J., Lubys, A. (2005) *J. Biol. Chem.*, **280**, 41584–41594.
16. Sapranaukas, R., Sasnauskas, G., Lagunavicius, A., Vilkaitis, G., Lubys, A., Siksnyus, V. (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**, 30878–30885.
17. Sasnauskas, G., Halford, S.E., Siksnyus, V. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 6410–6415.
18. Stankevicius, K., Lubys, A., Timinskas, A., Vaitkeicius, D., Janulaitis,

- A. (1998) *Nucleic Acids Res.*, **26**, 1084–1091.
19. Hsieh, P.-C., Xiao, J.-P., O'Loane, D., Xu, S.-Y. (2000) *J. Bacteriol.*, **182**, 945–955.
20. Heiter, D.F., Lunnen, K.D. and Wilson, G.G. (2005) *J. Mol. Biol.* **348**, 631–640.
21. Bellamy, S.R.W., Milsom, S.E., Scott, D.J., Daniels, L.E., Wilson, G.G., Halford, S.E. (2005) *J. Mol. Biol.*, **348**, 641–653.
22. Xu, S.Y., Zhu, Z., Zhang, P., Chan, S.H., Samuelson, J.C., Xiao, J., Ingalls, D., Wilson, G.G. (2007) *Nucleic Acids Res.*, **35**, 4608–4618.
23. Kachalova G.S., Rogulin E.A., Artyukh R.I., Perevyazova T.A., Zhelez-naya L.A., Matvienko N.I., Bartunik H.D. (2005) *Acta Crystal.*, **F61**, 332–334.
24. Kachalova G.S., Rogulin E.A., Yunusova A.K., Artyukh R.I., Perevyazova T.A., Matvienko N.I., Zhelez-naya L.A., Bartunik H.D. (2008) *J. Mol. Biol.*, **348**, 489–502.
25. Wah, D.A., Hirsch, J.A., Dorner, L.F., Schildkraut, I., Aggarwal, A.K. (1997) *Nature*, **388**, 97–100.
26. Pingoud, A., Jeltsch, A. (2001) *Nucl. Acids Res.*, **29**, 3705–3727.
27. Pingoud, A., Fuxreiter, M., Pingoud, V., Wende, W. (2005) *Cell. Mol. Life Sci.*, **62**, 685–707.
28. Viadiu, H., Aggarwal, A.K. (1998) *Nat. Struct. Biol.*, **5**, 910–916.
29. Kachalova G.S., Yunusova A.K., Artyukh R.I., Rogulin E.A., Perevyazova T.A., Zhelez-naya L.A., Matvienko N.I., Bartunik H.D. (2007) *Acta Crystal.*, **F63**, 795–797.
30. Xu, Y., Lunnen, D., Kong, H. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 12990–12995.
31. Demidov, V.V., Protozanova, E., Izvolsky, K.I., Price C., Nielsen, P.E., Frank-Kamenetskii, M.D.. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 15953–15958.
32. Protozanova, E., Demidov V.V., Soldatenkov, V., Chasovskikh, S., Frank-Kamenetskii M.D. (2002) *EMBO Rep.*, **3**, 956–961.
33. Nuovo, G.J. (2000) *Diagn. Mol. Pathol.*, **9**, 195–202.
34. Andras, S.C., Power, J.B., Cocking, E.C., Davey, M.R. (2001) *Mol. Biotechnol.*, **9**, 29–44.
35. Schweitzer, B., Kingsmore, S. (2001) *Curr. Opin. Biotechnol.*, **12**, 21–27.
36. Walker, G.T., Little, M.C., Nadeau, J.G., Shank, D.D. (1992) *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **89**, 392–396.
37. Hebert, M.L. and Wells, R.D. *J. Mol. Biol.*, 2005. **353**, 961–979.
38. Bylund, G.O., Burgers, P.M. (2005) *Mol. Cell Biol.*, **25**, 5445–55.
39. Van Ness, J., Van Ness, L.K., Galas, D.J. (2003) *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **100**, 4504–4509.
40. Bath, J., Green, S.J., Turberfield, A.J. (2005) *Angew. Chem. Int. Ed.*, **44**, 4358–4361.
41. Tyagi, S., Kramer, F.R. (1996). *Nat. Biotechnol.*, **14**, 303–308.
42. Железная, Л.А., Перевязова, Т.А., Железнякова, Е.Н., Матвиенко, Н.И. (2002) *Биохимия*, **67**, 595–600.
43. Zhelez-naya, L.A., Kopein, D.S., Rogulin, E.A., Sergey, I. Gubanov, S.I., Matvienko, N.I. (2006) *Anal. Biochem.*, **248**, 123–126.
44. Kuhn, H., Frank-Kamenetskii, M.D. (2008) *Nucleic Acids Res.*, **36**, e40.
45. Wang, L., Hall, J. G., Lu, M., Liu, Q., Smith, L. M. A (2001) *Nat. Biotechnol.*, **19**, 1053–1059.

46. Zhang, X., Yan, H., Shen, Z., Seeman, N.C. (2002) *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 12940–12941.

47. Chan, S-H., Zhu, Z., Van Etten, J.L., Xu, S-Y. (2004) *Nucleic Acids Res.*, **32**, 6187–6199.