

# МЕХАНИЗМЫ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ SSB-БЕЛКОВ В ПРОЦЕССАХ КЛЕТОЧНОГО МЕТАБОЛИЗМА ДНК

©2008 г. П. Е. ПЕСТРЯКОВ, О. И. ЛАВРИК

*Институт химической биологии и фундаментальной медицины  
СО РАН, Новосибирск*

I. Введение. II. Участие SSB-белков в процессах метаболизма ДНК. III. Строение SSB-белков. IV. Особенности доменной структуры SSB-белков и механизм их взаимодействия с ДНК. V. Заключение.

## I. ВВЕДЕНИЕ

SSB-белки (single-stranded DNA-binding proteins; белки, связывающие одноцепочечную ДНК) можно отнести к числу наиболее распространенных клеточных белков, что справедливо как для белков эукариотических организмов, так и для белков эубактерий и архей [1, 2]. Белки SSB кодируются и некоторыми вирусными геномами бактериофагов и аденовирусов [3, 4]. Основное свойство белков данной группы заключается в их способности с высоким сродством неспецифично связываться с оцДНК; именно эта особенность SSB-белков и их участие в основных клеточных процессах, поддерживающих целостность генома и возможность передачи генетической информации, определяют их роль в жизненном цикле любой живой клетки.

*Принятые сокращения:* SSB – белок, связывающий одноцепочечную ДНК; RPA – репликативный белок А; оцДНК – одноцепочечная ДНК; дцДНК – двуцепочечная ДНК; *ecoSSB* – *Escherichia coli* SSB; *hsRPA* – *Homo sapiens* RPA; PCNA – ядерный антиген пролиферирующих клеток; RFC – репликативный фактор С; *pol-prim* – ДНК-полимераза альфа-праймазный комплекс; ОВ-домен – домен, связывающий олигосахариды и олигонуклеотиды; NER – процесс эксцизионной репарации нуклеотидов; а.о. – аминокислотные остатки; нт – нуклеотидные остатки.

*Адрес для корреспонденции:* lavrik@niboch.nsc.ru

Работа была выполнена при поддержке грантов РФФИ №№ 06-04-48612, 08-04-00704-а, 08-04-91202-ЯФ, INTAS-SBRAS 06-100013-9210, МНТЦ № 3312.

На многих стадиях процессов репликации, репарации, рекомбинации ДНК белковые ферменты и факторы взаимодействуют непосредственно с одноцепочечной формой ДНК. Однако молекулы оцДНК имеют тенденцию к образованию вторичной структуры, что может мешать протеканию данных процессов. Кроме того, молекулы оцДНК могут также подвергаться действию внутриклеточных нуклеаз. SSB-белки, связываясь с оцДНК, выступают в качестве ее протекторов и стабилизаторов, препятствуя действию нуклеаз и удерживая ДНК в ее функционально-активном одноцепочечном состоянии [1, 2]. Зачастую в результате связывания оцДНК SSB-белками формируется особый белок-нуклеиновый комплекс, который впоследствии распознается белковыми факторами и ферментами, участвующими в процессах метаболизма ДНК (см., например, [5]). Очевидно, что структурная организация такого комплекса определяет дальнейшее протекание процесса. При этом SSB-белки способны стимулировать работу ключевых ферментов репликации и репарации ДНК – ДНК-полимераз, а также мультибелковых комплексов, обеспечивающих процессы обмена цепей при гомологичной рекомбинации [1, 2, 6, 7].

В настоящем обзоре рассмотрены механизмы, с помощью которых SSB-белки осуществляют координирование процессов репликации и репарации ДНК, а также характеристики эукариотических, прокариотических и архейных SSB-белков, что позволило выделить ряд общих закономерностей функционирования белков в организмах, относящихся к разным доменам жизни. В заключительной части обзора обсуждаются механизмы взаимодействия SSB-белков с ДНК в процессах метаболизма, проанализирована структурная организация комплексов, образуемых SSB-белками с ДНК, а также связанные с этим особенности строения различных SSB-белков. Отдельно рассмотрены функции репликативного белка А в процессах репликации и репарации ДНК.

## **II. УЧАСТИЕ SSB-БЕЛКОВ В ПРОЦЕССАХ МЕТАБОЛИЗМА ДНК**

Передача генетической информации и поддержание ее стабильности – сложный многостадийный процесс. Трудно представить себе, что все разнообразные каталитические функции, необходимые для протекания такого рода процессов, реализуются с участием одного многофункционального белка. В действительности они осуществляются с участием сложных мультибелковых ансамблей. В настоящее время принято считать, что в основе систем репликации,

репарации, рекомбинации и транскрипции ДНК лежит взаимодействие функциональных белковых ансамблей. При этом некоторые ферменты и белковые факторы могут вовлекаться не в один, а в несколько из перечисленных процессов [8, 9]. Например, «ферментативная машина», синтезирующая ДНК в S-фазе клеточного цикла, активно используется на этапах ресинтеза коротких участков ДНК в процессах рекомбинации и репарации. Процесс репарации ДНК протекает параллельно с репликацией и транскрипцией, так как структура ДНК, участвующая в этих процессах, подвержена воздействию повреждающих агентов. Кроме того, проверка ДНК на наличие в ней повреждений легче осуществляется именно в ходе этих процессов. Рекомбинация ДНК служит не только для обмена генетической информацией при кроссинговере во время мейоза, но и в качестве механизма репарации во время S-фазы клеточного цикла, этапа, связанного с репликацией ДНК. Таким образом, все рассматриваемые процессы тесно взаимодействуют друг с другом. В качестве связующих элементов между различными этапами процессинга ДНК можно рассматривать ферменты и белковые факторы, участвующие на каждом из этих этапов. Одними из кандидатов на эту роль, несомненно, являются SSB-белки, вовлеченные в такие фундаментальные процессы, как репликация, репарация и рекомбинация ДНК.

#### SSB-БЕЛКИ – КЛЮЧЕВЫЕ УЧАСТНИКИ ПРОЦЕССОВ РЕПАРАЦИИ, РЕПЛИКАЦИИ И РЕКОМБИНАЦИИ ДНК

К настоящему времени установлено, что SSB-белки, так же как их эукариотические гомологи – репликативные белки А (RPA), выступают в качестве необходимых компонентов систем репликации, репарации и рекомбинации ДНК. Связываясь с оцДНК, белки препятствуют образованию вторичной структуры ДНК, затрудняющей процессы ее репликации, репарации и рекомбинации. Известно, что присутствие SSB-белков увеличивает среднюю скорость синтеза ДНК бактериальными и архейными ДНК-полимеразами [1, 6, 7]. Кроме того, в некоторых случаях повышается и точность синтеза ДНК, катализируемого ДНК-полимеразами, как, например, в случае ДНК-полимеразы *Thermus thermophilus*, которая сама по себе не обладает корректирующей активностью [5, 10]. Известно, что ряд SSB-белков участвует в непосредственных белок-белковых взаимодействиях с другими факторами и ферментами. Так, например, SSB *E. coli* (ecoSSB) взаимодействует с соответствующей ДНК-полимеразой II, белок gp32 фага T4 – с полимеразой gp43 и gp2.5 фага T7 аналогично взаимодействует с соответствующей ДНК-полимеразой [3, 4, 6].

В свою очередь, эукариотические RPA также взаимодействуют с соответствующими ДНК-полимеразами. Репликативный белок А человека (hsRPA) способен непосредственно влиять на активность ДНК-полимеразы дельта. Механизм этого взаимодействия, впрочем, сложен, так как для его реализации необходима сборка мультибелкового комплекса, включающего ядерный антиген пролиферирующих клеток (PCNA) и репликативный фактор С (RFC) [11, 12]. hsRPA стимулирует работу другой репликативной полимеразы – ДНК-полимеразы альфа, способствуя ее продвижению через сайты «паузирования» при синтезе ДНК [13]. В опытах *in vitro* было показано, что, наряду с увеличением процессивности, RPA повышает и точность синтеза ДНК [14]. Предполагают, что в паре с ДНК-полимеразой альфа hsRPA выполняет такую же роль, как и PCNA с ДНК-полимеразой дельта – эти белки «удерживают» фермент на ДНК-субстрате [14]. Однако стимулирующее действие может смениться ингибирующим. Так, в условиях избытка hsRPA возникает конкуренция между этим белком и ДНК-полимеразой за связывание с ДНК-субстратом, что приводит к смещению полимеразы с ДНК [14].

Для архейных организмов также есть примеры специфического взаимодействия SSB-белков и соответствующих ДНК-полимераз. Например, полимеразы PolBI из *Methanosarcina acetivorans*, так же как и ее функциональный аналог – эукариотическая ДНК-полимераза альфа, не является высокопроцессивной. Однако известно, что процессивность и скорость синтеза ДНК, катализируемого этой полимеразой, а также аналогичной полимеразой из *Pyrococcus furiosus*, повышаются в присутствии соответствующих архейных аналогов PCNA и RFC, а также любого из трех гомологов *M. acetivorans* RPA [15, 16]. Противоположная ситуация характерна для других архейных представителей SSB-белков – *Methanothermobacter thermoautotrophicus* RPA (mthRPA) и *Methanopyrus kandleri* RPA (mkaRPA). SSB-белки этих организмов в широком диапазоне концентраций способны ингибировать действие соответствующих ДНК-полимераз mthPolBI и mkaPolBI [17, 18]. Интересно, что ингибирование носит высокоспецифический характер и, по-видимому, не связано с блокированием ДНК-субстрата SSB-белком, поскольку бактериальный есоSSB не способен оказать такого влияния на mthPolBI и mkaPolBI [17, 18]. Нужно отметить, что непосредственные взаимодействия между mthPolBI и mthRPA могут быть выявлены методами иммунопреципитации и совместного центрифугирования в градиенте плотности [18].

*Механизмы работы ферментативных машин репликации  
и репарации ДНК*

В настоящее время можно рассматривать две различные модели структур, обеспечивающих считывание и коррекцию информации, заложенной в ДНК в клетке: модель заранее сформированных белковых ансамблей – «суперфермента» и модель «динамических» комплексов с ДНК (концепция «передачи ДНК-субстрата» от одного белка или белкового комплекса к другому) [19].

Первая модель предполагает сборку больших белковых комплексов, в которых объединены практически все участники ферментативных превращений ДНК. Согласно этой модели, после сборки происходит продвижение такого комплекса вдоль процессируемой ДНК (или, наоборот, продвижение ДНК через такой комплекс) с последовательным осуществлением всех каталитических стадий процесса мультибелковым «суперферментом». В рамках этой модели можно рассматривать «концепцию реплисомы», основанную на результатах изучения системы репликации прокариот и перенесенную на систему репликации эукариот [9, 20, 21].

Вторая модель предполагает динамическое связывание с ДНК и последующую ассоциацию лишь некоторых белковых факторов, активность которых требуется на данном конкретном этапе процессинга ДНК (см., например, [22, 23]). При этом в остальное время белковые факторы находятся вне такого комплекса в клеточном ядре. Главное отличие от предыдущей модели заключается в меньшем размере мультибелкового ферментативного комплекса и особой роли слабых взаимодействий, которые позволяют динамично формировать и изменять состав участников процесса. Динамичность, свойственная этой модели, открывает большие возможности для регуляции процесса. Например, предполагают, что эта модель может лежать в основе механизма эксцизионной репарации нуклеотидов и гомологичной рекомбинации [22, 23].

В рамках обеих моделей особое внимание уделяют таким особенностям белков, как наличие нескольких центров связывания, которые могут взаимодействовать с разными лигандами, будь то ДНК или белок. Эти свойства должны обеспечить возможность формирования разнообразного набора сложно организованных белок-нуклеиновых комплексов. Конкуренция за один и тот же связывающий центр между двумя молекулами лиганда позволяет реализовать переходы одного типа комплекса в другой и передачу субстрата от одного белка к другому (будь то ДНК-субстрат или заранее сформированный белок-нуклеиновый комплекс) [19].

*Многоцентровые взаимодействия SSB-белков с лигандами*

В общем случае белки, участвующие в процессах, связанных с процессингом ДНК, отличаются модульностью строения. Несколько доменов такого белка выполняют разные биохимические функции. Между собой эти структурно-функциональные участки соединены подвижными линкерными областями. С одной стороны, каждый из доменов оказывается высокоспециализированным для оптимального выполнения конкретной биохимической функции, с другой, объединение разных доменов в одном белке позволяет координировать эти функции между собой. Модульность строения белков определяет специфику функционирования мультибелковых комплексов – в них образуется сразу несколько контактов между любой парой участников [20, 22, 23]. Стадии же ферментативного превращения осуществляются без диссоциации белка из комплекса, но с заменой одних связей в комплексе другими, сопровождающейся изменением структурной организации комплекса [22]. Для таких комплексов характерно варьирование константы ассоциации каждого из отдельных белков в них в широких пределах вплоть до значений  $10^{10} \text{ M}^{-1}$  в зависимости от числа контактов образующихся между этим белком и его партнерами [19]. С другой стороны, тот факт, что компоненты комплекса сразу взаимодействуют посредством нескольких связывающих центров, обеспечивает несколько возможных путей регулирования этих взаимодействий.

В качестве примера можно рассмотреть работу репликативного мультибелкового комплекса, состоящего из ДНК-полимеразы дельта, RFC и репликативного белка А. В ходе репликации RFC взаимодействует с RPA тремя из пяти своих субъединиц [11]. Считается, что на поверхности RPA расположено два сайта связывания с RFC, причем один из них перекрывается с сайтом связывания ДНК-полимеразы дельта. Во время переключения репликативной машины с синтеза ДНК при участии ДНК-полимеразы альфа на синтез, осуществляемый ДНК-полимеразой дельта, последняя конкурирует с RFC за связывание с одним из двух сайтов на поверхности RPA [11]. Однако за счет второго сайта связывания RFC остается в мультибелковом репликативном комплексе, что чрезвычайно важно для работы репликативной машины.

В качестве другого примера можно привести взаимодействие RPA с одноцепочечной ДНК. Константа диссоциации комплекса каждого из двух основных ДНК-связывающих доменов субъединицы p70 (p70A и p70B) с ДНК лежит в микромолярной области, что отражает невысокое сродство к одноцепочечной ДНК [24]. Однако общее

сродство тандема доменов р70АВ к ДНК на три порядка выше, чем сродство отдельных доменов белка; константа диссоциации комплекса р70АВ•оцДНК уже относится к наномолярному диапазону [24]. Значительное различие значений этих констант объясняется так называемым «линкерным эффектом», который обусловлен подвижным соединением двух соседних ДНК-связывающих доменов линкерной областью размером 10 аминокислотных остатков.

#### *Универсальность доменов SSB-белков*

Особенностью белков, участвующих в процессинге ДНК, является универсальность доменов, составляющих эти белки. В SSB-белках к числу потенциально универсальных доменов следует отнести ОВ-домены (oligosaccharide/oligonucleotide binding domain). Согласно базе данных структурной классификации белков SCOP [25], ОВ-домены могут участвовать в связывании как нуклеиновых кислот, так и олигосахаридных фрагментов, а в последнее время набор функций этого типа доменов дополнен еще и пептидсвязывающей активностью [25]. Кроме уже упомянутых процессов репликации, репарации, рекомбинации ДНК, ОВ-домены принимают непосредственное участие в транскрипции, трансляции, клеточном ответе на действие низких температур и поддержании теломеров [26, 27]. ОВ-домены встречаются в таких разных белках, как нуклеазы, пирофосфатазы, оцДНК- и РНК-связывающие белки [25].

Анализ функций ОВ-доменов SSB-белков показывает, что даже в наиболее просто организованных SSB эубактерий ОВ-домены могут быть универсальными: они отвечают за связывание с ДНК и тетрамеризацию белка [28, 29]. Особенно ярко универсальность ОВ-укладки проявляется в более сложно организованных эукариотических SSB-белках. Из 6 ОВ-доменов RPA человека четыре домена – р70А, р70В, р70С и р32D участвуют в высокоаффинном связывании ДНК [1, 30]. В то же время р70С, р32D и субъединица р14, представляющая тоже ОВ-домен, задействованы в образовании гетеротримерного комплекса RPA [31]. Как свидетельствует ряд экспериментальных данных [32–34], высокоаффинные ДНК-связывающие домены р70А и р70В могут взаимодействовать с белковыми партнерами RPA. К последним относятся Т-антиген вируса SV40, факторы репарации и рекомбинации XPA и Rad51 и т.д. N-концевой ОВ-домен субъединицы р70 – р70NTD, задействован исключительно в белок-белковых взаимодействиях [30]. В число его партнеров входят такие белки, как р53, XPA и транскрипционные факторы Gal4, VP16 [35–37].

Интересно отметить, что в составе эукариотического RPA не только OB-домены являются потенциально универсальными по своим функциональным возможностям. Единственный домен RPA, не принадлежащий к OB-укладкам, р32CTD принадлежит к семейству wHTH доменов («спираль–поворот–спираль»). В hsRPA этот домен участвует исключительно в белок-белковых взаимодействиях [30, 38], однако родственные домены того же семейства включены в состав ряда факторов транскрипции, а также в геликазу RecQ *E. coli*, осуществляя взаимодействие этих белков с двуцепочечной формой ДНК [38, 39].

#### *Конкуренция лигандов за связывание с SSB-белками*

Для эукариотического RPA характерно наличие перекрывающихся сайтов связывания между его партнерами по процессам метаболизма ДНК [11, 38, 40]. В эукариотической репликации в качестве конкурентных взаимодействий с участием SSB-белков можно рассмотреть конкуренцию между ДНК-полимераза альфа-праймазным комплексом (pol-prim), RFC и ДНК-полимеразой дельта за места связывания на RPA. Каждый из этих трех белков, по-видимому, имеет перекрывающиеся сайты взаимодействия с RPA, что обеспечивает передачу ДНК-субстрата, связанного с RPA, при переходе от стадии праймирования ДНК к стадии элонгации праймера [11]. В качестве другого примера, касающегося RPA, можно привести взаимодействие одного и того же сайта в С-концевом домене субъединицы р32 – р32CTD, с тремя разными белками процессов репарации – урацил-ДНК-гликозилазой (UNG2), участвующей в эксцизионной репарации оснований, фактором эксцизионной репарации нуклеотидов ХРА и рекомбинационным белком Rad52 [38]. Конкуренция этих белков за связывание с RPA может быть использована в процессе передачи комплекса RPA с ДНК-субстратом от одного белка репарации другому. Возможно, именно такой механизм координирует между собой процессы эксцизионной репарации оснований, эксцизионной репарации нуклеотидов и рекомбинации ДНК. Недавние исследования, проведенные с помощью метода ядерного магнитного резонанса, показывают, что белки ХРА и Rad51 связываются в канонической области одного из главных ДНК-связывающих доменов RPA – р70А [32, 41]. Кроме того, при проведении экспериментов были получены данные о том, что присутствие одноцепочечной ДНК разрушает комплекс, который образуется с N-концевым доменом белка рекомбинации Rad51 (Rad51N). Это также может свидетельствовать о перекрывании областей связывания указанных лигандов [41]. Вполне возможно, что в этом случае конкуренция



между ДНК и Rad51N за связывание с RPA отвечает за передачу ДНК от RPA другим участникам начальных стадий процесса гомологичной рекомбинации.

### III. СТРОЕНИЕ SSB-БЕЛКОВ

К числу SSB-белков принято причислять белки, которые способны с высоким сродством связываться с одноцепочечной формой ДНК, демонстрируя при этом гораздо более низкое сродство по отношению к другим формам ДНК. Считается, что для белка также должно соблюдаться хотя бы одно из нижеследующих условий: 1) ген, кодирующий белок, должен быть необходимым для репликации ДНК; 2) белок должен стимулировать активность репликативной ДНК-полимеразы; 3) белок должен непосредственно взаимодействовать с другими факторами и ферментами репликации; 4) белок должен связывать стехиометрические количества ДНК [6]. Неудивительно, что при таких достаточно широких критериях отбора известные на сегодняшний день SSB-белки достаточно сильно отличаются друг от друга по своей структуре. По субъединичному строению их можно разделить на три группы. В первую группу следует отнести гомотетрамерные белки, каждая субъединица (протомер) которых кодируется одним и тем же геном. Следующую группу представляют гомодимерные белки. И, наконец, к белкам третьей группы относятся наиболее сложные в плане организации гетеротримеры, состоящие из трех разных субъединиц.

Кроме различий в субъединичном строении, разные группы SSB-белков отличаются и по аминокислотным последовательностям [26, 42, 43], что затрудняет поиск гомологов в уже известных геномах организмов. С другой стороны, интенсивное исследование третичной и четвертичной структур с помощью методов рентгеноструктурного анализа и ядерного магнитного резонанса дает возможность выделить общие черты в строении и функционировании такой разнообразной группы белков. Так, в основе строения всех SSB белков, известных к настоящему времени, обнаружен структурный мотив, который называют «ОВ-домен» или «ОВ-укладка» (OB-fold – oligosaccharide/oligonucleotide binding fold; укладка, связывающая олигосахариды и олигонуклеотиды) [26].

#### ГОМОТЕТРАМЕРНЫЕ SSB-БЕЛКИ

Большая часть протомеров эубактериальных SSB содержит в своем составе только одну ОВ-укладку, но активные формы этих белков

существуют в виде гомотетрамеров. Правилу «один ssb-ген – 1 OB-домен» не подчиняются только три из двухсот пятидесяти бактериальных геномов [44–47]. Основой эубактериальных SSB-протомеров является N-концевой ДНК-связывающий домен, который и содержит структуру, имеющую OB-укладку. С-концевая область SSB-белков этой группы обладает достаточно лабильной структурой [47]. В пределах этой области содержатся консервативные отрицательно заряженные остатки аминокислот, наличие которых характерно для всех эубактериальных SSB.

Наиболее изученным представителем гомотетрамерных белков этого класса является есоSSB. Этот белок, необходимый для жизнедеятельности клетки, принимает участие в таких важнейших процессах, как репликация, репарация и рекомбинация ДНК. Мономер белка обладает молекулярной массой около 19 кДа и состоит из 177 аминокислотных остатков, из которых 120 а.о. приходится на ДНК-связывающий OB-домен [48]. Кроме ДНК-связывающей активности, этот домен участвует и в формировании гомотетрамерной структуры и взаимодействии с OB-доменами других протомеров. Функциональная форма есоSSB представляет собой комплекс четырех протомеров, характеризующихся функциональной эквивалентностью. Такой «функционально симметричный» гомотетрамер может образовывать с ДНК несколько различных типов комплексов, отличающихся стабильностью, размерами связанной ДНК, а также «кооперативностью» посадки белка [2].

По своему строению митохондриальные SSB-белки похожи на эубактериальные SSB. Интересно отметить, что совпадение аминокислотных последовательностей, к примеру, между белком SSB из митохондрий человека и есоSSB составляет всего 36%, однако методом рентгеноструктурного анализа, показано, что структура протомеров этих белков, а также механизм формирования гомотетрамерной формы практически одинаковы [49, 50]. Белки, кроме того, схожи по своим биохимическим характеристикам [49, 51].

#### ГОМОДИМЕРНЫЕ SSB-БЕЛКИ

Следующая группа SSB-белков имеет гомодимерное строение. В первую из подгрупп этого типа SSB следует отнести трех представителей домена эубактерий, которые являются исключением из гомотетрамерных эубактериальных SSB. Это белки tthSSB, taqSSB и draSSB, выделенные из экстремальных термофилов *Thermus thermophilus*, *Thermus aquaticus* и *Deinococcus radiodurans*, соответственно. Протомеры белков этой подгруппы имеют несвойственные остальным эубактериаль-

ным SSB большие размеры. Длина аминокислотных последовательностей tthSSB, taqSSB, draSSB составляет соответственно 263, 264 и 301 а.о., а молекулярная масса протомера 29.9, 30 и 32.6 кДа [52–54]. Анализ аминокислотных последовательностей этих белков свидетельствует о существовании по крайней мере двух ОБ-укладок в составе каждого протомера. Между собой эти два ОБ-домена соединены линкером с очень консервативной вторичной структурой, предполагающей образование  $\beta$ -складки [52, 53, 55]. Таким образом, несмотря на то, что рассматриваемые SSB имеют гомодимерное строение, в их состав, как и у остальных эубактериальных SSB, включено четыре ОБ-домена.

Интересно отметить, что ДНК-связывающие домены каждого протомера имеют в своей структуре сходные элементы, различающиеся, однако, по аминокислотной последовательности. Методом сравнительного моделирования был найден целый ряд аминокислотных остатков в С-концевом ОБ-домене draSSB, которые соответствуют аминокислотным остаткам из ОБ-укладки эубактериального esoSSB, участвующим в связывании с ДНК [54, 55]. В то же самое время аналогичная трехмерная модель N-концевого домена показывает, что отсутствует ряд важных связей характерных, для комплексов белка с ДНК. Вполне возможно, что такая неэквивалентность доменов должна отражаться на характере взаимодействия полного гомодимера SSB с ДНК, отличая его тем самым от гомотетрамерных эубактериальных SSB.

Другая особенность рассматриваемых белков по сравнению с эубактериальными SSB – наличие в функциональной гомодимерной форме белка только двух консервативных С-концевых неструктурированных участков, присущих всем эубактериальным белкам [55]. Так как в эубактериальных SSB аналогичные области отвечают за взаимодействие с белковыми партнерами, то можно предположить, что и характер белок-белковых взаимодействий гомодимерных эубактериальных SSB отличается от наблюдаемых у гомотетрамерных аналогов.

Другой вариант гомодимерных SSB встречается в некоторых организмах царства эуриархеот домена архей. В этих белках структура отдельного мономера еще сильнее отличается от структуры мономеров эубактериальных белков. Как и в первой группе, в составе мономера находится 2 ОБ-укладки, но, в отличие от всех эубактериальных белков в С-концевой части протомера расположен не отрицательно заряженный участок аминокислотных остатков, а структурный элемент, получивший название «цинковый палец» [17]. Этот элемент не

встречается в эубактериальных, но является неременным атрибутом эукариотических SSB-белков. Следует, однако, заметить, что структура «цинкового пальца» у архейных белков несколько отличается от той, которая встречается в эукариотических SSB.

Самыми простыми по доменному строению среди гомодимерных SSB являются SSB-белки бактериофагов, такие как белок gp32 фага T4, белок gp2.5 фага T7 и gpV фага fd (семейство 50315 – фаговых белков, связывающих одноцепочечную ДНК, согласно базе данных структурной классификации белков SCOP [25]). Молекулярная масса мономера этих белков невелика – для gp32 всего 35 кДа. Как правило, протимер бактериофаговых SSB представляет собой единственный ДНК-связывающий домен, который является ОВ-доменом, и может содержать С-концевой участок, несущий отрицательнозаряженные аминокислотные остатки [28]. Согласно базе данных SCOP [25], в структуре белка gp32 фага T4 также присутствует еще и N-концевой домен «LAST» ((Lys/Arg)<sub>3</sub>(Ser/Thr)<sub>2</sub>), который отвечает за кооперативное взаимодействие нескольких белков с ДНК. Как правило, фаговые белки в растворе существуют в виде димеров, а процесс дальнейшей олигомеризации осуществляется при очень высоких концентрациях белка. Таким образом, в составе функциональных гомодимеров фаговых белков можно выделить только 2 ОВ-домена.

#### ГЕТЕРОТРИМЕРНЫЕ SSB-БЕЛКИ, РЕПЛИКАТИВНЫЙ БЕЛОК А

Третья группа SSB-белков включает в себя гетеротримерные комплексы, состоящие из трех различающихся субъединиц. Такие белки встречаются в клетках всех эукариот – от дрожжей до человека, являясь основными эукариотическими SSB-белками. Представители этой группы SSB-белков обозначаются по названию первого открытого представителя – репликативными белками А или RPA [1]. Все гомологи RPA состоят из трех различных полипептидов, об их родстве между собой и между другими SSB-белками свидетельствует тот факт, что каждая из субъединиц несет, по крайней мере, по одному ОВ-домену.

Из подгруппы эукариотических белков наиболее хорошо изучен репликативный белок А человека [1]. Как и прокариотические SSB, RPA играет ключевую роль в процессах репликации, репарации и рекомбинации ДНК. По своей структуре hsRPA представляет собой стабильный гетеротример, состоящий из трех субъединиц с молекулярными массами 70, 32 и 14 кДа. В структуре RPA различают 7 доменов, из них 6 доменов представлены ОВ-укладками. В отличие

от эубактериальных белков все ОБ-домены hsRPA отличаются друг от друга как по строению, так и по выполняемым функциям [30].

Большая субъединица p70 RPA содержит 4 ОБ-домена [1]. N-концевой домен (p70NTD) отделен от остальной части субъединицы достаточно протяженным линкером и считается одним из двух доменов RPA, отвечающих за белок-белковые взаимодействия. В центральном фрагменте этой же субъединицы лежит тандем двух ДНК-связывающих доменов (p70A и p70B), обладающих высокой ДНК-связывающей активностью [56]. В С-концевой части расположен еще один ДНК-связывающий домен (p70C), который, кроме всего прочего, участвует в формировании гетеротримера RPA [31]. В структуре этого же домена можно выделить и фрагмент «цинковый палец» или «цинковая лента», который, как уже упоминалось, является консервативным для всех гомологов RPA и свойствен также некоторым гомодимерным SSB эуриархеот [57, 58]. Средняя субъединица RPA – p32, несет еще один ДНК-связывающий домен, представляющий собой ОБ-укладку (p32D) [59]. Кроме того, в С-концевой части субъединицы находится домен p32CTD, отвечающий за белок-белковые взаимодействия, относящийся к семейству WHTH-доменов (winged helix–turn–helix, «спираль–поворот–спираль») [38]. Неструктурированный N-концевой участок субъединицы p32 – p32N, служит мишенью для фосфорилирования клеточными киназами, отвечающими за прохождение клеточного цикла, а также участвующими в ответе клетки на повреждения ДНК [7]. Третья субъединица белка – p14, представляет собой единый домен, в основе которого опять-таки лежит ОБ-укладка [60].

Несмотря на то, что в структуре эукариотических RPA можно насчитать 6 ОБ-доменов, отличающих их от описанных ранее гомодимерных и гомотетрамерных SSB, большинство исследователей до сих пор считают, что только 4 из них – p70A, p70B, p70C и p32D, могут непосредственно участвовать в связывании ДНК.

#### SSB-БЕЛКИ ДРУГОГО СУБЪЕДИНИЧНОГО СТРОЕНИЯ

Некоторые известные на данный момент SSB-белки не укладываются в вышеприведенную классификацию. Так, в структуре белков из *Methanococcus jannaschii* и *Methanobacterium thermoautotrophicus* присутствует, соответственно, 4 и 5 ОБ-доменов и домен «цинковый палец», что отличает их от всех других SSB-белков [42, 61]. Архейный организм *Methanopyrus kandleri* отличается тем, что содержит только один ген, кодирующий ДНК-связывающий белок, но сам белок является не гомотетрамером или гомодимером, как в случае SSB,

а гомотримером [17]. Рассмотренные представители по наличию фрагмента «цинковый палец» очень напоминают эукариотические или другие эуариархейные белки, но, как мы видим, отличаются структурой мономера.

SSB-белок одного из представителей царства кренархей домена архей – SSB из *Sulfolobus solfataricus*, наоборот, по доменному строению скорее мог бы быть отнесен к эубактериальным гомотетрамерным белкам – в его составе ОВ-домен фланкирован С-концевой отрицательнозаряженной областью с консервативными остатками аспартата [62]. Однако, как показывают биохимические исследования, этот белок не образует многосубъединичного комплекса, а выполняет свою функцию в виде мономера [63].

#### IV. ОСОБЕННОСТИ ДОМЕННОЙ СТРУКТУРЫ SSB-БЕЛКОВ И МЕХАНИЗМ ИХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ С ДНК

##### ОВ-ДОМЕН – ОСНОВА СТРУКТУРНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ SSB-БЕЛКОВ

Результаты исследования структуры, образуемой ОВ-доменами с ДНК и РНК в составе разных белок-нуклеиновых комплексов, позволяют сделать вывод, что, несмотря на низкую степень сходства аминокислотных последовательностей разных доменов этого семейства, можно выделить ряд топологических структурных особенностей, которые являются общими для всех ОВ-укладок [27].

Размеры индивидуального ОВ-домена невелики и укладываются в диапазон от 70 до 150 аминокислотных остатков (см. [26]). Различия в размере ОВ-доменов вызваны, в первую очередь, размером переменных петель, расположенных между достаточно консервативными элементами  $\beta$ -слоев. Топологически полипептидная цепь ОВ-укладки (рис. 1) формирует 2 антипараллельных  $\beta$ -слоя по 3 участка полипептидной цепи в каждом, причем одна из этих  $\beta$ -цепей (под номером 1) является общей для обоих слоев [26]. Получающиеся  $\beta$ -слои располагаются ортогонально друг другу и формируют  $\beta$ -цилиндр с топологией расположения цепей  $\beta 1$ - $\beta 2$ - $\beta 3$ - $\beta 5$ - $\beta 4$ - $\beta 1$ . Обычно каноническая поверхность взаимодействия ОВ-укладки с лигандами располагается в районе цепей  $\beta 2$  и  $\beta 3$  (рис. 2). Дополнительно во взаимодействии могут участвовать петли между  $\beta 1$  и  $\beta 2$  (петля L12),  $\beta 3$  и  $\alpha$  (петля L3a),  $\alpha$  и  $\beta 4$  (петля La4) и, наконец, между  $\beta 4$  и  $\beta 5$  (петля L45). Эти петли формируют ложбинку, которая проходит по поверхности домена перпендикулярно к оси топологического  $\beta$ -цилиндра. Большая часть олигонуклеотидных лигандов связывается именно в этой ложбинке, располагаясь перпендикулярно

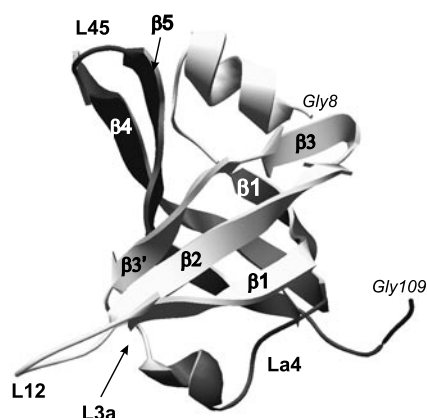


Рис. 1. Каноническая структура OB-домена на примере третичной структуры N-концевого домена (а.о. 8–109) субъединицы р70 репликативного белка А человека (запись под номером 1EWI в базе данных RCSB Protein Data Bank). На рисунке также обозначены элементы вторичной структуры домена:  $\beta$ -цепи  $\beta 1$ ,  $\beta 2$ ,  $\beta 3$ ,  $\beta 3'$  и  $\beta 1$ ,  $\beta 4$ ,  $\beta 5$ , формирующие соответственно два  $\beta$ -слоя. Показано пространственное положение петель полипептидной цепи L12, L3a, La4 и L45.

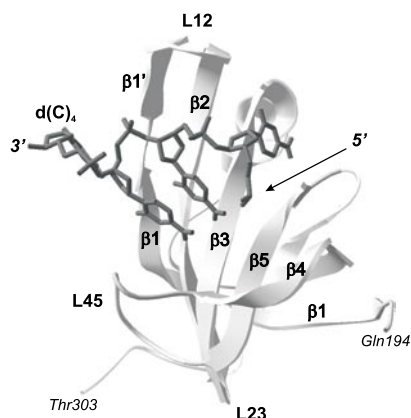


Рис. 2. «Прямая полярность» связывания нуклеиновых кислот на примере третичной структуры комплекса OB-домена р70А (а.о. 194–303) hsRPA с олигонуклеотидным остатком  $d(C)_4$  (выделен темно-серым) [64]. На рисунке также обозначены элементы вторичной структуры домена:  $\beta$ -цепи  $\beta 1$ ,  $\beta 1'$ ,  $\beta 2$ ,  $\beta 3$ ,  $\beta 4$  и  $\beta 5$ , петли полипептидной цепи L12, L23 и L45.

к  $\beta$ -слоям. При этом «полярность», т.е. ориентация связывания лигандов, может быть различной. Если связывание олигонуклеотида от 5'-конца к 3'-концу происходит участками полипептидной цепи  $\beta 4$  и  $\beta 5$  и далее по направлению к  $\beta 2$ , то говорят о «прямой полярности» связывания лиганда.

В целом, согласно данным рентгеноструктурного анализа и ЯМР, вышеупомянутые петли L12, L3a, La4, L45 представляют собой очень эффективную поверхность узнавания и связывания одноцепочечных нуклеиновых кислот [27]. Остатки аминокислот, формирующих эти участки в различных белках, участвуют и в ароматических «стэкинг»-взаимодействиях, и в образовании водородных связей с молекулами нуклеиновой кислоты, и в полярных взаимодействиях (см. напр. [56]).

#### *Универсальность функций, выполняемых OB-доменами*

Согласно базе данных SCOP [25], белки, в которых есть домены, построенные с участием OB-укладки, присутствуют в 10 суперсемействах, сформированных в соответствии с выполняемыми функциями. Белки,

связывающие нуклеиновые кислоты, составляют основную часть белков, в составе которых встречаются ОВ-домены. В границах этого суперсемейства можно в свою очередь выделить еще 12 семейств, отличающихся между собой видом домена [25]. С точки зрения выполняемой функции можно разделить эти белки на 3 подгруппы: 1) нуклеотид-связывающие белки, не обладающие выраженной специфичностью к нуклеотидной последовательности (в эту подгруппу входят такие белки, как интересующие нас hsRPA и есоSSB), 2) белки, распознающие специфические участки одноцепочечной ДНК (терминатор транскрипции Rho из *E. coli*, Cdc13 из *Saccharomyces cerevisiae*, белок, связывающий концы теломеров ТЕВР, аспартил-тРНК-синтетаза), 3) белки, связывающиеся с неспиральными структурированными нуклеиновыми кислотами (рибосомальные белки S12, S17 и фактор инициации IF1 из *T. thermophilus*).

*Структурные особенности ОВ-доменов, участвующих  
в связывании нуклеиновых кислот*

В настоящее время известна трехмерная структура N-концевого фрагмента есоSSB размером 135 а.о., находящегося как в свободном состоянии, так и в комплексе с оцДНК размером 35 нт [65, 66]. Напомним, что именно этот фрагмент несет в своей структуре ДНК-связывающий ОВ-домен. Когда ДНК находится в комплексе с гомотетрамером есоSSB, каждая из мономерных субъединиц образует с ДНК множественные контакты [65]. Обширная поверхность взаимодействия в комплексах отличается от «канонической», встречаемой в других ОВ-содержащих белках, и включает в себя обе стороны протяженного  $\beta$ -слоя в районе L23 (рис. 3). На основании данных рентгеноструктурного анализа также можно сделать вывод о том, что «полярность связывания» лиганда для мономерных субъединиц есоSSB отличается от других белков, она называется «обратной полярностью».

Семейство нуклеотид-связывающих ОВ-доменов характеризуется отсутствием ярко выраженного сходства аминокислотных последовательностей. В то же время, как уже отмечалось, эти домены обладают высокой степенью структурной гомологии. На основании анализа 14 структур ОВ-укладок, проведенного в работе [27], были определены структурные детерминанты нуклеотид-связывающих ОВ-укладок. Показано, что около 30 аминокислотных остатков занимают структурно-консервативные положения, при этом значение среднеквадратичного отклонения смещений атомов (RMSD, Root



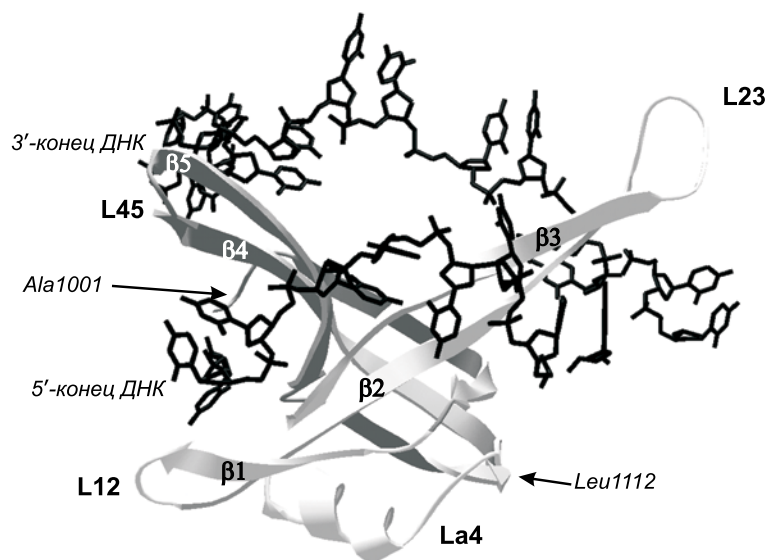


Рис. 3. Третичная структура ОБ-домена (а.о. 1001–1112) протомера *ecoSSB*, связанного с 23-звенным олигонуклеотидом (выделен черным) [66]. На рисунке также обозначены элементы вторичной структуры домена:  $\beta$ -цепи  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_3$ ,  $\beta_4$  и  $\beta_5$ , петли полипептидной цепи L12, L23, La4 и L45.

Mean Square Deviation) для всех структур не превышает 2.1 Å. Тем не менее степень идентичности аминокислотных последовательностей канонических элементов вторичной структуры ОБ-укладок, таких как  $\beta$ -цепи и  $\alpha$ -спираль, составляла лишь 12% [27].

#### Механизм взаимодействия ОБ-доменов с ДНК

Анализ трехмерных структур, полученных для целого ряда комплексов ОБ-содержащих белков с ДНК и РНК, показывает, что чаще всего белок контактирует с азотистыми основаниями нуклеиновой кислоты, в то время как ее фосфатные группы развернуты в направлении «от белка» [64, 67]. По-видимому, такие взаимодействия характерны в целом для белков, связывающих одноцепочечную форму РНК/ДНК или же сложные структуры нуклеиновых кислот, сформированные с образованием петель. В контактах с белком важную роль играют стэкинг-взаимодействия нуклеотидных остатков с ароматическими аминокислотными остатками белка, а также неполярные взаимодействия колец рибозы или азотистых оснований с гидрофобными боковыми радикалами аминокислотных остатков, а

в некоторых случаях – с алифатической частью бокового радикала лизина и аргинина [27, 64, 67]. У ряда ОВ-содержащих белков, таких как белок, связывающий концы теломеров ТЕВР, и фактор инициации IF1, обнаруживаются даже такие необычные взаимодействия, как стэкинг-взаимодействия между  $\pi$ -орбиталями азотистого основания и заряженным боковым радикалом аргинина. В тех случаях, когда связывание должно осуществляться с определенными последовательностями нуклеиновой кислоты, в распознавании могут участвовать и полярные боковые радикалы, которые формируют водородные связи только с определенными азотистыми основаниями.

В работе [26] на основании тщательного анализа трехмерных структур пяти комплексов была определена каноническая поверхность взаимодействия ОВ-доменов с лигандами. Лиганд располагается между цепями  $\beta 2$  и  $\beta 3$ , с которыми и формируются основные связи, кроме того, образуются контакты с С-концевыми участками цепей  $\beta 1$  и  $\beta 5$ . В ряде случаев дополнительно к этим каноническим контактам могут возникать контакты и с другими участками домена, что значительно увеличивает поверхность взаимодействия с лигандом. Для белков, связывающих одноцепочечные нуклеиновые кислоты, лиганд располагается в левой части ОВ-домена в непосредственной близости к петлям L23, L12, L3a, L45 и оказывается «прижатым» к поверхности слоя, сформированного цепями  $\beta 2$  и  $\beta 3$  [26]. В связывании не принимают участия N-концевая часть цепи  $\beta 1$  (до ее перегиба) и N-концевая часть  $\beta 4$ , роль которых, скорее всего, заключается в поддержании целостности третичной структуры всего домена.

Как уже подчеркивалось выше, петли L12, L3a (в отсутствие  $\alpha$ -спирали – петля L34) и L45 играют особую роль в модулировании взаимодействий ОВ-домена с произвольными лигандами. Для ОВ-доменов, связывающих нуклеиновые кислоты, важную роль также играет петля L23 [27]. Размеры ее значительно варьируют: от 7 а.о. в составе *E. coli* Rho, до 28 и 18 а.о. в cdc13 и ecoSSB, соответственно; эти выводы основаны на информации о трехмерных структурах 2A8V, 1KXL и 1EYG, полученных из базы данных PDB [68]. Следует отметить, что большой размер именно этой петли значительно увеличивает площадь соприкосновения между белком и ДНК в случае ecoSSB [66]. Это относится и к другим петлям – их размеры в разных белках сильно отличаются и вполне возможно, что такая вариабельность служит хорошей основой для формирования самых разнообразных поверхностей связывания лиганда. Поэтому белки, построенные на основе ОВ-домена, могут обладать самыми разнообразными размерами сайта связывания с нуклеиновой кисло-

той, причем этот размер коррелирует с размером петель, достигая 31 нуклеотидного звена для рибосомального белка S17 *T. thermophilus* [69]. В большинстве случаев для белков, связывающих нуклеиновые кислоты, размер сайта связывания ОВ-домена лежит в диапазоне 2–11 нуклеотидных звеньев [27].

Сравнение трехмерной структуры нескольких белков в комплексе с нуклеиновой кислотой и в свободном состоянии показывает, что, как правило, ОВ-домен и/или лиганд изменяют свою конформацию при связывании [56, 65, 66, 70, 71]. Изменения, в первую очередь, затрагивают положение петель и цепей самой ОВ-укладки, однако может наблюдаться и конформационная перестройка других доменов белка, выворачивание азотистых оснований нуклеиновой кислоты и изменение ее пространственной структуры. Указанные изменения могут происходить как по отдельности, так и совместно. Они могут быть невелики по своему масштабу, но приводят к тому, что белок или лиганд приобретает специфическую конформацию. Например, при связывании с ДНК тандема ДНК-связывающих доменов р70А и р70В репликативного белка А в структуре самих ОВ-доменов наблюдаются лишь незначительные изменения (RMSD при совмещении трехмерных структур свободного и ДНК-связанного ОВ-домена не превышает 1 Å) [56, 65]. Эти незначительные изменения затрагивают практически исключительно положение петель L12 и L45. Однако в комплексе ДНК-белок происходит переориентация доменов друг относительно друга и их «упорядочивание» на цепи ДНК (рис. 4). Тандем доменов формирует канал, в котором укладывается цепь ДНК [56]. В такой структуре наблюдают более плотное «обхватывание» ДНК белком и вытягивание как цепи ДНК, так и тандема ДНК-связывающих доменов вдоль нее.

Известные на данный момент трехмерные структуры комплексов ОВ-доменов с нуклеиновыми кислотами свидетельствуют о том, что возможны две различные ориентации лиганда относительно этого домена [26, 27]. Как уже упоминалось выше, «нормальной ориентацией» принято считать вариант, когда 5'-конец нуклеиновой кислоты располагается вблизи цепей β4 и β5, а ее 3'-конец – вблизи β2. Большая часть комплексов, для которых известна трехмерная структура, характеризуется именно такой ориентацией. Исключение составляют комплексы ДНК с белками есоSSB и β-субъединицей теломер-связывающего белка ТЕВР, в которых «полярность» расположения ДНК не соответствует вышеуказанной [66, 72].

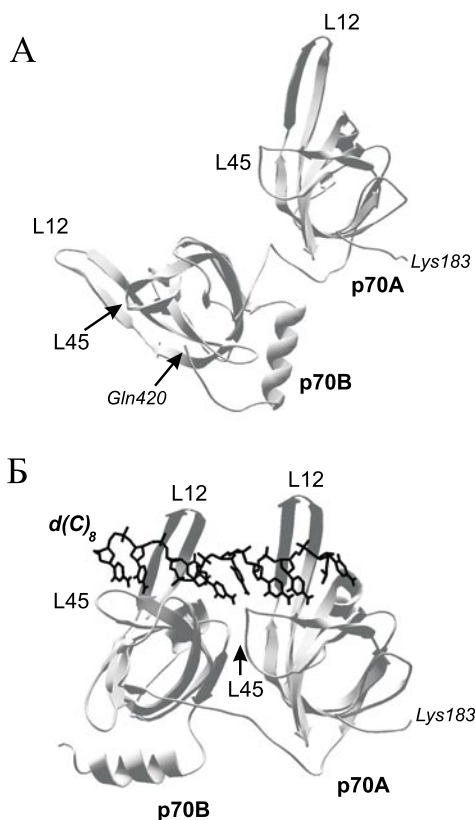


Рис. 4. Трехмерная структура тандема ДНК-связывающих доменов p70A и p70B (а.о. 183–420) hsRPA в отсутствие ДНК (А), а также в комплексе с дезоксиоктацитидином (выделен черным) (Б) [70]. На рисунке обозначены петли L12 и L45 полипептидной цепи каждого домена, участвующие во взаимодействии с олигонуклеотидным лигандом.

#### ДРУГИЕ ДОМЕНЫ SSB-БЕЛКОВ

##### *С-концевая часть эубактериальных SSB*

Как уже было сказано, в структуре эубактериальных SSB протомеров различают две части – N-концевой ДНК-связывающий ОВ-домен и С-концевую часть. В отличие от ОВ-домена С-концевая область гораздо менее структурирована, и попытки разрешить ее трехмерную структуру с помощью методов рентгеноструктурного анализа и ЯМР до сих пор не увенчались успехом [73]. Однако эта область важна для выполнения белком своих функций и несет десять консервативных

для эубактериальных SSB, отрицательнозаряженных аминокислотных остатков, включающих четыре аспартата. Несмотря на то, что С-концевая область необходима для выживания клеток *in vivo*, она не участвует ни в связывании с ДНК, ни в образовании гомотетрамерной структуры [28] и, по-видимому, является посредником при взаимодействии SSB с другими белками.

*«Цинковый палец» эукариотических и эуриархейных RPA*

Ионы металлов в качестве кофакторов часто способствуют стабилизации трехмерной структуры белка и определенной укладки полипептидной цепи, играя, таким образом, важную структурную роль [74]. Ионы цинка широко представлены в структурных элементах, называемых «цинковый палец» и «цинковая лента». Размер таких элементов третичной структуры варьирует от 30 до 100 аминокислотных остатков [75]. Функциональная роль этих доменов заключается в связывании нуклеиновых кислот, белков и пептидов или малых лигандов. Белки, содержащие «цинковый палец», участвуют в регуляции процессов метаболизма ДНК, транскрипции, трансляции, метаболизме металлов. Встречающиеся фрагменты «цинковый палец» можно разделить, по крайней мере, на 8 групп, в которых остатки гистидина и цистеина являются инвариантными аминокислотными остатками, создающими координационную сферу для иона цинка [76]. Координированный таким образом ион способствует приобретению фрагментом третичной структуры с топологией  $\beta\beta\alpha$ , которая не образуется без ионов металла [76]. Заполнение координационной сферы иона боковыми радикалами аминокислотных остатков приводит к тому, что катализ реакций с его участием практически невозможен [77].

В SSB-белках «цинковый палец» является консервативным для представителей эукариот и эуриархеот. Структура фрагмента в этих двух группах белков различна. У эукариотических белков консервативный фрагмент «цинковый палец» встречается в С-концевом участке большой субъединицы белка (p70 в hsRPA, см. рис. 5). С точки зрения первичной структуры эукариотический фрагмент принадлежит к семейству  $X_3CX_{2-4}CX_{12-15}CX_2C$  (где С – остатки цистеина, а Х – любой другой аминокислотный остаток) [78]. Этот фрагмент располагается внутри С-концевого домена в районе одной из переменных петель ОВ-укладки. Сходный по первичной структуре фрагмент найден и в гомологах RPA из *M. jannaschii* и *M. Thermoautotrophicus* –  $CX_2CX_{12}CX_2C$  и  $CX_2CX_{11}CX_2C$ , хотя эти белки отличаются от эукариотических белков своей субъединичной

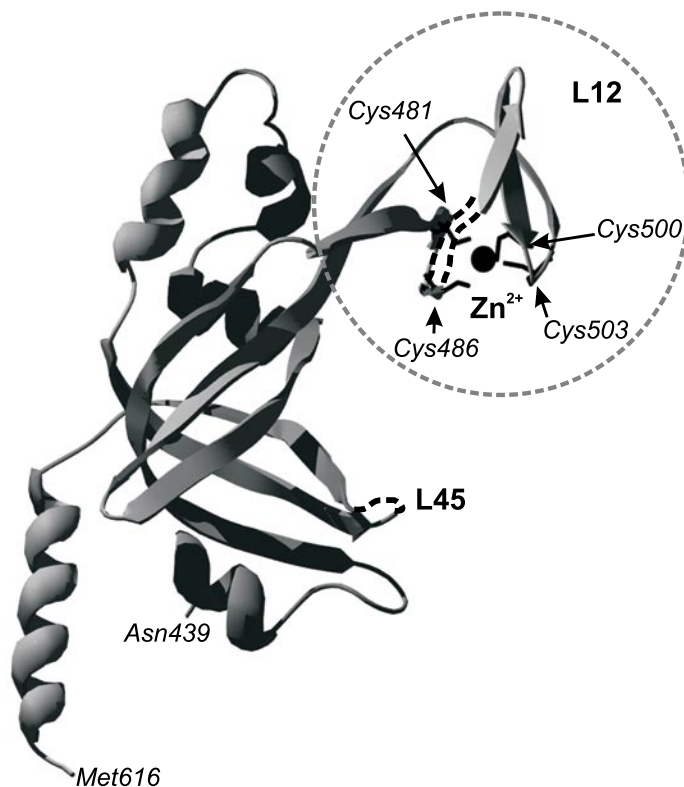


Рис. 5. Трехмерная структура домена p70C (а.о. 439–616) hsRPA [31]. Пунктиром обозначен фрагмент «цинковый палец». Показаны положения остатков цистеина, формирующих фрагмент, и ион цинка, находящийся в его составе (выделен черным). На рисунке также обозначены петли L12 и L45 полипептидной цепи домена.

организацией [18, 42]. В эуриархеотах фрагмент «цинковый палец» имеет несколько иную аминокислотную последовательность. Он включает в свой состав один остаток гистидина –  $CX_2CX_{8-14}CX_2H$  (где С – остатки цистеина, Н – гистидина, а Х – любой другой аминокислотный остаток) [15]. В тех белках, которые имеют гетеротримерную структуру, «цинковый палец» так же, как и в эукариотическом RPA, располагается в С-концевой части большой субъединицы (например, RPA из *P. furiosus* [79]). В гомодимерных белках, несущих по 2 ОВ-домена в каждой субъединице, «цинковый палец» можно обнаружить в их С-концевой части. Для гомодимерных белков из родов *Methanosarcinales*, *Methanopyrales* и *Ferroplasmatales* характерной

особенностью является строгое соответствие фрагмента «цинковый палец» структуре  $CX_2CX_8CX_2H$ , т.е. строго постоянное количество произвольных а.о. между остатками цистеина и гистидина [17].

Несмотря на то, что трехмерная структура домена, включающего фрагмент «цинковый палец», описана только для RPA из клеток человека [31], для нескольких эуриархейных белков показано, что аминокислотный фрагмент  $CX_2CX_{8-14}CX_2H$  действительно связывает ион цинка. Об этом свидетельствуют результаты биохимических исследований, проведенных с использованием мутантных форм белков [57]. Кроме того, анализ спектра кругового дихроизма этих эуриархейных RPA показал, что в присутствии иона цинка в составе белка происходит формирование определенной вторичной структуры [57].

Несмотря на это, а также и на тот факт, что в эукариотических белках «цинковый палец» расположен внутри одного из ДНК-связывающих доменов, экспериментальные данные показывают, что он не является необходимым для связывания белка с ДНК. Некоторые авторы высказывают предположение лишь о его потенциальном участии в процессе связывания с нуклеиновыми кислотами [78, 80], поскольку наличие ионов цинка в буфере, а также присутствие в растворе реагентов, способствующих поддержанию остатков цистеина в восстановленном состоянии, незначительно увеличивают сродство к ДНК. Интересно, что и у представителей эуриархейных белков, таких как *pac3RPA* из *M. acetivorans*, цинковый палец не играет ключевой роли в связывании с ДНК, поскольку константа диссоциации формы белка, несущего мутации в этом фрагменте, незначительно отличается от таковой для белка дикого типа [17, 57].

#### ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ SSB-БЕЛКОВ С ДНК

Наиболее изученными объектами для исследования биохимических свойств SSB-белков зубактерий и эукариот являются гомотетрамерный *ecoSSB* и гетеротримерный *hsRPA*. Для обоих белков показано несколько вариантов их связывания с одноцепочечной ДНК. Наиболее заметное отличие этих типов связывания заключается в размере участка ДНК, взаимодействующего с этими белками, который зависит от таких условий, как ионная сила раствора, концентрация  $NaCl$ , концентрация дивалентных катионов, концентрация белка, pH и температура [30, 81]. Для *ecoSSB* известными и достаточно изученными вариантами являются два типа комплекса с оцДНК –  $SSB_{35}$  с размером сайта связывания 33–35 нуклеотидных остатков и  $SSB_{65}$ , в котором связанными оказываются 65 нт. Как уже отмечалось, в составе *ecoSSB* находится 4 эквивалентных ДНК-связывающих OB-домена – по

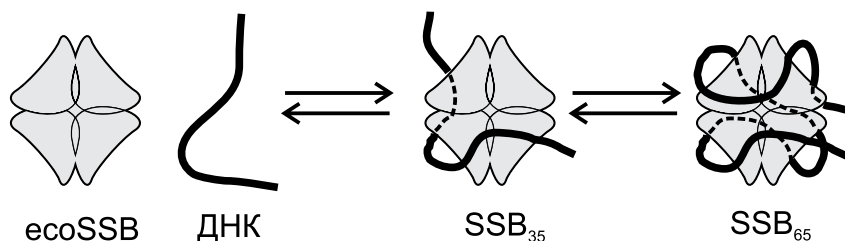


Рис. 6. Гипотетическая модель образования комплексов типа SSB<sub>35</sub> и SSB<sub>65</sub> при взаимодействии ecoSSB с оцДНК [2].

одному в каждой из субъединиц. Согласно результатам исследований, проведенных биохимическими методами, а также методом рентгеноструктурного анализа тип связывания SSB<sub>35</sub> обусловлен контактом двух из этих ДНК-связывающих доменов с ДНК (рис. 6). В комплексах, построенных по типу SSB<sub>65</sub>, 65 нуклеотидных остатков ДНК связаны со всеми четырьмя протомерами, при этом, как предполагают, происходит сильное изменение третичной структуры ДНК, обусловленное ее изгибом [66, 82]. С-концевые участки протомеров не участвуют в связывании, а консервативные аминокислотные остатки, локализованные в этих районах, несут отрицательный заряд. Трехмерная структура SSB в комплексе с ДНК, полученная методом рентгеноструктурного анализа, показывает, что С-концевые участки протомеров в таких комплексах остаются неструктурированными [73].

Эукариотические гомологи RPA также формируют с оцДНК комплексы различной архитектуры, различающиеся размером сайта связывания. Наиболее исследованными являются комплексы hsRPA с оцДНК, в которых связанными оказываются 8–10 и 30 нуклеотидных остатков оцДНК (такие комплексы обозначают как RPA10 и RPA30, соответственно). Несмотря на то, что получить кристаллы полного гетеротримерного комплекса hsRPA не удалось, методом рентгеноструктурного анализа были получены трехмерные структуры всех ДНК-связывающих доменов в hsRPA [31, 70], а также разрешена структура комплекса, состоящего из тандема доменов р70А и р70В с одноцепочечным 8-звенным отрезком ДНК [56]. Это позволило выдвинуть гипотезу о механизме, по которому формируются разные типы комплексов [31].

Предполагают, что при связывании RPA с ДНК образуется несколько типов комплексов RPA с ДНК, которые последовательно переходят друг в друга. Сначала образуется менее стабильный комплекс типа RPA10, в котором ДНК-связывающие домены р70А



и р70В оказываются связанными с 8–10 нуклеотидными остатками цепи ДНК. Возможность образования такого комплекса подтверждена результатами рентгеноструктурного анализа тандема ДНК-связывающих доменов р70А и р70В с дезоксиоктацитидином [56]. Согласно модели трехмерной структуры комплекса, в непосредственном контакте с каждым ОВ-доменом находятся по 3 нуклеотидных звена оцДНК, еще 2 нуклеотидных звена располагаются между белковыми доменами. Таким образом, восемь нуклеотидных остатков, которые «экранируются» тандемом доменов р70А и р70В, определяют размер сайта посадки RPA на оцДНК для комплексов типа RPA10. Если размер одноцепочечной ДНК превышает 8–10 нуклеотидных звеньев, то возможно последующее изменение конформации белка, его вытягивание вдоль цепи ДНК, в результате чего в контакт с оцДНК вступают два других ДНК-связывающих домена – р70С и р32D [83]. Принято считать, что таким образом формируются комплексы типа RPA17 и RPA30, которые отличаются размером сайта посадки белка на ДНК – 17 и 30 нт, соответственно [70, 84]. Методами аффинной модификации и протеолитического расщепления показано, что архитектура взаимодействия белок-ДНК в этих типах комплексов существенно различна [85, 86], что и находит отражение в их разной стабильности [30]. Наименее стабильными являются комплексы, образованные по типу связывания RPA10, а наиболее стабильными – по типу связывания RPA30.

Данные по аффинной модификации RPA в комплексе с оцДНК свидетельствуют о специфической ориентации субъединиц эукариотического SSB-белка на одноцепочечной ДНК. Более эффективно с 5'-областью оцДНК взаимодействует субъединица р70, а с 3'-областью – субъединица р32. В комплексах, образованных по типу RPA30, «полярное» расположение RPA на одноцепочечной ДНК обусловлено связыванием домена р32D субъединицы р32 вблизи 3'-конца оцДНК, а доменов р70А, р70В, р70С субъединицы р70 преимущественно вблизи 5'-конца ДНК [21, 83, 84, 87, 88].

По данным, полученным с помощью метода электронной микроскопии, в комплексах RPA, в которых участок связывания с ДНК имеет максимальный размер (тип RPA30), не происходит «оборачивания» ДНК вокруг молекулы белка, как это наблюдали для комплексов прокариотического есоSSB, образованных по типу SSB<sub>65</sub> [89–91]. Таким образом, механизмы формирования комплексов эукариотического и прокариотического белков имеют свои особенности. В есоSSB отсутствует основной выраженный ДНК-связывающий центр, поскольку белок составлен из эквивалентных протомеров. Более того,

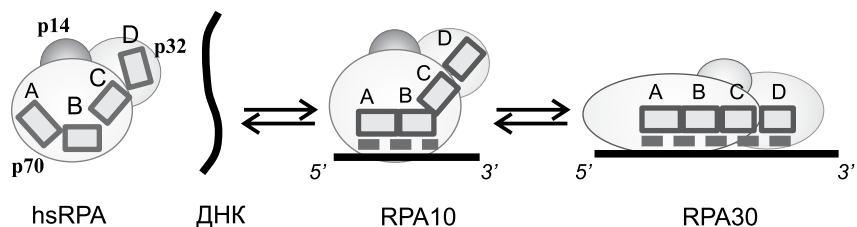


Рис. 7. Гипотетическая модель образования комплексов типа RPA10 и RPA30 при взаимодействии hsRPA с оцДНК. Пунктиром обозначена область взаимодействия hsRPA с ДНК, показано участие ДНК-связывающих доменов р70А, р70В, р70С и р32D RPA в формировании комплексов различной архитектуры. Домены схематично представлены в виде прямоугольников, обозначенных А, В, С и D.

согласно данным рентгеноструктурного анализа, молекула тетраметра обладает пространственной симметрией, и взаимодействия между любыми двумя протомерами есоSSB, несущими по одному ДНК-связывающему домену, эквивалентны [65]. В гетеротримере эукариотического hsRPA также все субъединицы попарно образуют контакты друг с другом, однако анализ трехмерной структуры комплекса тример-формирующих участков субъединиц показывает, что связи между субъединицами неэквивалентны [31]. Кроме того, в hsRPA основная ДНК-связывающая активность локализована в большой субъединице р70, которая сама по себе может достаточно легко изменять конформацию. Доказательства конформационной мобильности этой субъединицы RPA были получены с помощью метода ограниченного протеолитического расщепления [85, 86]. Таким образом, можно предположить, что эукариотический белок обладает большей конформационной подвижностью по сравнению с прокариотическим. При связывании всех ДНК-связывающих доменов hsRPA с ДНК, наблюдается изменение глобулярной конформации белка на протяженную [84, 89, 90], то есть происходит «вытягивание» молекулы hsRPA вдоль молекулы ДНК (рис. 7). В то же время изменения в конформации молекулы ДНК минимальны.

В рамках модели перехода одного типа связывания в другой можно объяснить также то, что тип образующегося комплекса RPA–ДНК зависит не только от размера доступной оцДНК-платформы, но и от соотношения концентраций RPA и ДНК [84]. Для реализации типа связывания RPA30, в котором оцДНК связана всеми ДНК-связывающими доменами, необходимо соблюдение ряда условий. Во-первых, размер непрерывного одноцепочечного участка должен позволять осуществить последовательную укладку всех ДНК-свя-

зывающих доменов белка на ДНК; во-вторых, условия связывания должны способствовать посадке только одной молекулы RPA на этот непрерывный одноцепочечный участок. Учитывая невысокую кооперативность при связывании RPA по типу RPA30 [92], такой вариант реализуется, когда концентрация белка меньше концентрации оцДНК. Если же концентрация RPA превышает концентрацию ДНК, то преобладает вероятность того, что связывание пойдет по пути последовательной «загрузки» нескольких молекул RPA на оцДНК. В таком случае происходит конкурентное вытеснение низкоаффинных ДНК-связывающих доменов p70C и p32D одной молекулы RPA высокоаффинными доменами p70A и p70B второй молекулы белка [84].

Для прокариотического SSB сродство всех протомеров к ДНК одинаково, и для таких белков переход комплексов  $SSB_{65}$  в  $SSB_{35}$  обусловлен, в отличие от эукариотических белков, различием в топологии этих комплексов [2]. Напомним, что в комплексах  $SSB_{65}$  наблюдают значительный изгиб молекулы оцДНК относительно молекулы белка. По-видимому, своеобразное «оборачивание» становится невыгодным в случае высоких концентраций белка, и вместо этого происходит кооперативная посадка следующей молекулы [2]. Отмеченная особенность отражается в разнице коэффициентов кооперативности посадки для прокариотического и эукариотического белка, которая достигает трех порядков [2]. Несмотря на это, вплоть до недавнего времени считалось, что механизм связывания оцДНК, благодаря которому осуществляется взаимный переход двух типов связывания, является универсальным для прокариотических и эукариотических SSB-белков. В более стабильном комплексе ( $SSB_{65}$  или RPA30) с ДНК взаимодействуют четыре OB-домена, в менее стабильном ( $SSB_{35}$  или RPA10) – только два. Возможность образования с оцДНК комплексов, которые не укладываются в предложенную модель, была отмечена для эукариотического RPA лишь недавно с использованием метода фотоаффинной модификации [87]. В работе была показана возможность реализации такой архитектуры комплекса RPA–ДНК, в которой гетеротример контактирует с одноцепочечной ДНК с участием субъединицы p14 [87]. В предполагаемом комплексе размер сайта связывания находится в пределах 10 нуклеотидных остатков, а взаимодействие с ДНК осуществляется субъединицами p70 и p14. Ген, кодирующий малую субъединицу RPA (p14), абсолютно необходим для жизнедеятельности клетки [93, 94], что может говорить о важной роли комплексов такого типа в динамическом процессе взаимодействия RPA с ДНК во время репликации и репарации ДНК.

Учитывая общие эволюционные корни, можно предположить, что архейные белки, так же как эукариотические и эубактериальные, способны образовывать разные типы комплексов с ДНК. Однако на сегодняшний день механизм взаимодействия архейных белков с оцДНК менее изучен. Большая часть RPA из царства эуриархеот обладают высоким сродством к оцДНК (величина константы диссоциации комплекса  $K_d$  лежит в пределах 7–80 нМ), при этом кооперативность связывания этих белков с оцДНК невысока (значения коэффициента Хилла –  $n$ , являющегося показателем кооперативности, лежит в районе 2–3, что близко по величине к характеристике типа RPA30 для эукариотического hsRPA) [17, 92]. Наблюдаемые размеры сайта связывания оцДНК для эуриархейных белков несколько отличаются от значений, известных для типичных представителей эубактерий и эукариот – ecoSSB и hsRPA. В работе [15] показано, что для эуриархейных гомологов RPA – tac1RPA и tac3RPA из *M. acetivorans*, в их наиболее стабильных комплексах с ДНК размер сайта связывания равен 20 нуклеотидным звеньям. С другой стороны, для этих белков показана возможность связывания десятизвенных олигонуклеотидов, что свидетельствует в пользу существования второго, менее стабильного типа комплексов tac1RPA и tac3RPA с ДНК [15]. Результаты экспериментов также показали, что механизм формирования этих комплексов различен. Если в одном случае молекула оцДНК при связывании «оборачивается» вокруг белка, как это происходит в комплексах SSB<sub>65</sub> прокариотического ecoSSB, то другой тип комплексов образуется по пути, характерному для эукариотического hsRPA, когда молекула ДНК не претерпевает значительных конформационных изменений [15].

Несмотря на то, что подавляющее большинство архейных, эубактериальных и эукариотических SSB-белков способны связывать ДНК двумя различными способами, у отдельных представителей известен лишь один тип формирующихся комплексов. В архейном организме *Ferroplasma acidarmanus* обнаружено сразу два разных RPA, которые являются паралогами друг другу [17]. Для каждого из них известен только один тип связывания с ДНК, причем «архитектура» образующихся при этом комплексов различна. Связывание одного из белков – fac1RPA, с ДНК всегда сопровождается оборачиванием ее цепи вокруг белка, в то время как в комплексах другого – fac2RPA, молекула ДНК сохраняет вытянутую протяженную форму [17]. Любопытно, что структурная организация двух этих белков также различна и, по-видимому, определяет описанный механизм взаимодействия с ДНК. По своему строению fac1RPA, образующий комплексы с топо-

логическим изгибом ДНК, напоминает эубактериальные SSB – в его структуре обнаружен только один домен, несущий ОВ-укладку. Белок *fac2RPA*, как способом взаимодействия с ДНК, так и своей доменной структурой, больше похож на эуриархейные SSB-белки – две ОВ-укладки и один «цинковый палец» на субъединицу белка [17]. Можно предположить, что в рассмотренном случае белки-паралоги, отличающиеся способами взаимодействия с ДНК, выполняют разные функции в клеточных процессах.

Рассмотренные варианты взаимодействия SSB-белков с ДНК относятся к ее одноцепочечному состоянию. Однако в ключевых процессах жизнедеятельности клетки, таких как репликация, репарация или рекомбинация, ДНК представлена более сложной формой. Частичные ДНК-дуплексные структуры с выступающими одноцепочечными участками лучше имитируют функционально значимые формы ДНК, чем оцДНК [84, 88]. Ключевые ферменты процессов репликации, ДНК-полимеразы, заполняют бреши в двуцепочечных участках и синтезируют новую цепь ДНК, используя в качестве затравки 3'-конец праймирующего нуклеотида. Таким образом, наибольший интерес представляет исследование взаимодействий SSB-белков с 3'-концом праймера частичного дуплекса в области перехода от одноцепочечной ДНК к двуцепочечной (оцДНК-дцДНК). Лучше всего этот тип взаимодействий изучен для эукариотического SSB-белка – репликативного белка А.

Модель, описывающая расположение RPA вблизи области перехода от двуцепочечной ДНК к одноцепочечной ДНК-матрице, выступающей в 5'-направлении, была построена на основании данных экспериментов по фотоаффинной модификации и ограниченному протеолитическому расщеплению (рис. 8) [84, 86, 94, 95]. Общность в архитектуре комплексов RPA с частичными ДНК-дуплексными структурами и с одноцепочечной ДНК заключается в том, что ДНК-связывающие домены *p70A* и *p70B* большой субъединицы вносят определяющий вклад во взаимодействие с одноцепочечным участком ДНК, тем самым обеспечивая необходимое сродство белка к ДНК-структуре [88, 93, 96]. В комплексах RPA с протяженной оцДНК домены *p70C* и *p32D* также могут находиться в контакте с оцДНК, однако при взаимодействии с частичными ДНК-дуплексами эти домены оказываются расположенными в области перехода одноцепочечной ДНК в двуцепочечную (см. рис. 8). Доказательства такой модели взаимодействия были получены с использованием частичных ДНК-дуплексов с различной длиной выступающего участка матрицы, содержащие фотореакционноспособную группу в области перехода одноцепочечной ДНК в двуцепочечную [84, 95].

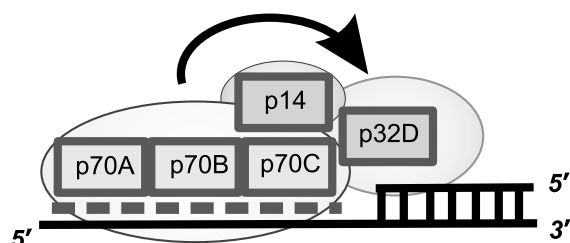


Рис. 8. Модель ориентированного взаимодействия hsRPA с ДНК в области перехода от дцДНК к оцДНК-матрице, выступающей в 5'-направлении. Пунктиром обозначена область взаимодействия hsRPA с одноцепочечной матричной цепью ДНК. Показано участие ДНК-связывающих доменов p70A, p70B, p70C и p32D и субъединицы p14 (представлены схематично в виде прямоугольников) RPA в формировании «полярного» ориентированного комплекса с ДНК.

С положением субъединицы p32 на ДНК-структуре связано основное различие рассматриваемых типов связывания. Если в случае комплексов RPA с оцДНК эта субъединица непосредственно взаимодействует с одноцепочечным участком, то в комплексах с частичными ДНК-дуплексами она размещается в районе перехода одноцепочечной ДНК в двуцепочечную [84, 87]. При этом домен p70C занимает место на одноцепочечном участке, а p32D непосредственно контактирует с 3'-концом праймера [86, 96].

Общей чертой всех рассматриваемых типов связывания является «полярность» взаимодействия RPA с ДНК. Методом фотоаффинного мечения с использованием ДНК-дуплексов, содержащих фотореакционноспособную группу в области перехода от двуцепочечной ДНК к одноцепочечной, показано, что при связывании частичных ДНК-дуплексов с 5'-концом запирающего олигонуклеотида взаимодействует субъединица p70, в то время как с 3'-концом праймирующего олигонуклеотида субъединица p32, если RPA принимает вытянутую конформацию, и p70, если глобулярную [84, 95]. Таким образом, ориентация этих субъединиц в комплексах RPA с оцДНК, в комплексах с частичными ДНК-дуплексами и протяженными брешами совпадает. Более того, при детальном исследовании механизма связывания было показано, что наличие тандема основных ДНК-связывающих доменов p70A и p70B не является обязательным для обеспечения специфического и ориентированного взаимодействия RPA с частичными ДНК-дуплексами [96]. В то же время присутствие в составе белка малой субъединицы p14 совершенно необходимо. В отсутствие этой субъединицы способность RPA к «полярной» укладке на ДНК теряется [97].

## ФАКТОРЫ, ВЛИЯЮЩИЕ НА ТИП СВЯЗЫВАНИЯ SSB-БЕЛКОВ С ДНК

Как уже обсуждалось, способность SSB-белка образовывать с ДНК несколько типов комплексов может использоваться в механизмах регулирования и координации процессов репарации, репликации, транскрипции и рекомбинации ДНК. Тип связывания белка с ДНК, конформация белка в образующихся комплексах зависят от размера доступного участка оцДНК, буферных условий и соотношения концентраций SSB и ДНК.

Регуляция пути образования комплекса того или иного вида может осуществляться разными способами. Так, для есоSSB тип связывания ( $SSB_{35}$  или  $SSB_{65}$ ) зависит от ионной силы раствора, соотношения концентраций белка и ДНК, концентрации двухвалентных ионов и размера оцДНК, доступной для связывания [81, 91]. Например, образование комплексов по типу  $SSB_{35}$  происходит при концентрации NaCl, меньшей 10 мМ. В диапазоне концентрации NaCl от 200 мМ до 5 М связывание идет с образованием комплексов типа  $SSB_{65}$ . Другие варианты связывания есоSSB с оцДНК с размером сайта связывания от 40 до 56 нт оцДНК наблюдают при концентрациях NaCl между 10 и 200 мМ, но они являются нестабильными и промежуточными между двумя основными [98].

Для эуриархейных и эукариотических RPA в качестве определяющего фактора при образовании того или иного вида комплекса может выступить наличие в буферных условиях окислителей или восстановителей [78]. Для поддержания структурной целостности фрагмента «цинковый палец», находящегося в составе указанных белков, требуется восстановленная форма остатков цистеина. Восстановительные условия, с одной стороны, препятствуют образованию дисульфидных связей между цистеинами, с другой стороны, окислительные условия способствуют окислению тиолята цинка (II) и высвобождению иона цинка из комплекса [80]. Присутствие восстанавливающих агентов, таких как DTT, в концентрациях до 1 мМ поддерживает вторичную структуру фрагмента «цинковый палец». Как уже отмечалось ранее, сам фрагмент не участвует непосредственно в связывании оцДНК, однако результаты исследований, проведенные с эуриархейным тас3RPA из *M. acetivorans* и с эукариотическим hsRPA человека, подчеркивают влияние структурной целостности «цинкового пальца» на общую конформацию белка и его ДНК-связывающую активность [57, 80].

РОЛЬ РАЗЛИЧНЫХ ТИПОВ СВЯЗЫВАНИЯ SSB-БЕЛКОВ С ДНК  
В ПРОЦЕССАХ РЕПЛИКАЦИИ И РЕПАРАЦИИ ДНК

Несомненно, что конформация SSB-белка и доступность его сайтов для белок-белковых взаимодействий определяют характер взаимодействия SSB с ферментами и факторами репликации, репарации, транскрипции и рекомбинации. Таким образом, сборка мультибелкового комплекса или стимулирование работы ферментов, а следовательно, и протекание ферментативного процесса в целом, будет зависеть от архитектуры комплекса SSB-белка с ДНК.

В настоящий момент известно несколько фактов, свидетельствующих о роли разных типов связывания SSB-белков с ДНК в процессах ее метаболизма [99]. Остановимся на тех из них, которые относятся к репликации ДНК, поскольку именно участие в репликации ДНК служит одним из основных критериев для отнесения белка к ряду SSB-белков. Эукариотический SSB-белок RPA абсолютно необходим для всех стадий репликации ДНК [1]. В модельной системе репликации партнером RPA является ключевой белок процесса инициации репликации – ДНК-полимераза альфа-праймаза (pol-prim), осуществляющая синтез РНК-праймера и его элонгацию на начальном этапе репликации [1]. В работе [97] было показано, что мутантные формы RPA, лишенные субъединицы p32 и/или p14, не способны обеспечивать синтез РНК-праймера и его элонгацию – стадий, катализируемых pol-prim. Несомненно, что отсутствие малых субъединиц RPA приводит к неспособности белка сформировать продуктивный тройной комплекс pol-prim•ДНК-субстрат•RPA. В формировании такого комплекса наряду с белок-белковыми взаимодействиями RPA с pol-prim огромную роль играет ориентированное взаимодействие RPA с ДНК-субстратом. В отсутствие малых субъединиц RPA формируется комплекс, не способный к «полярной» укладке субъединиц белка на ДНК. Такой комплекс не способен поддерживать синтез и элонгацию РНК-праймера [97].

Результаты, полученные при исследовании механизма элонгации РНК-ДНК-праймеров в реплицирующемся SV40 хроматине, также позволили выявить разные типы связывания RPA на различных этапах этого процесса [100, 101]. Продукты раннего синтеза праймера в основном контактируют с субъединицей p32 RPA, что свидетельствует о «вытянутой» конформации репликативного белка А, соответствующей его связыванию с ДНК типа RPA30. На более поздних этапах синтеза RPA принимает компактную глобулярную конформацию, соответствующую типу связывания RPA10, поскольку по мере элонгации праймера только субъединица p70 становится доступной



для контактов с 3'-концом растущей цепи [100, 101]. Эти данные находятся в полном согласии с экспериментами по фотоаффинной модификации RPA с использованием модельных ДНК-дуплексов [95]. Переход из одного типа связывания в другой может сопровождаться изменением влияния репликативного белка на соответствующую ДНК-полимеразу в результате изменения характера белок-белковых контактов. Например, обнаружено, что RPA не оказывает влияния на синтез ДНК по поврежденной матрице ДНК-полимеразой *лямбда*, если размер матричного участка равняется 36 нуклеотидным остаткам [102]. Однако стимулирующий эффект на синтез ДНК обнаружен в случае использования и ДНК-субстрата с выступающим матричным участком размером в 16 нуклеотидных остатков. Согласно предполагаемой модели взаимодействия RPA с частичными ДНК дуплексами в первом случае, находясь в комплексе, RPA принимает вытянутую конформацию, а во втором – глобулярную. Таким образом, результаты исследований свидетельствуют о том, что для выполнения RPA его функции в репликации ДНК важна способность белка формировать комплексы требуемой архитектуры.

Как упоминалось выше, RPA увеличивает точность синтеза ДНК, катализируемого ДНК-полимеразой альфа [14]. Недавно было также обнаружено, что RPA играет роль в обеспечении точности синтеза ДНК, катализируемого ДНК-полимеразой *лямбда* [103]. Позже выяснилось, что это влияние особенно выражено в случае синтеза, проводимого по поврежденной матрице. ДНК-полимераза *лямбда* способна синтезировать ДНК по матрице, несущей в качестве повреждения как 8-оксо-гуанин, так и 1,2-дигидро-2-оксо-аденин, но точность синтеза при этом невысока, то есть вероятность встраивания корректного нуклеотида (dCTP и dTTP, соответственно) сравнима с вероятностью встраивания «ошибочных» нуклеотидов (dATP и dGTP, соответственно) [104, 105].

На матрице, несущей в качестве повреждения 8-оксо-гуанин, RPA значительно уменьшает частоту ошибочного встраивания dATP. Присутствие в смеси дополнительно к RPA ядерного антигена пролиферируемых клеток (PCNA) способствует включению dCTP, что приводит к увеличению вероятности встраивания корректного нуклеотида ДНК-полимеразой *лямбда* в 1200 раз [104]. При синтезе на матрице, несущей другой тип повреждения (1,2-дигидро-2-оксо-аденин), совместное добавление PCNA и RPA увеличивает вероятность встраивания корректного dTTP в 166 раз [105]. Таким образом, RPA наряду с PCNA являются важными компонентами функционирующего репликативного комплекса, влияющими не только на основные

репликативные ДНК-полимеразы (ДНК-полимеразы альфа и дельта), но и на специализированные полимеразы, осуществляющие синтез ДНК в репликативной вилке, блокированного наличием повреждения в матричной цепи.

Помимо участия в репликации ДНК, RPA известен как важный участник одного из главных путей репарации ДНК – процесса эксцизионной репарации нуклеотидов (NER). В этом процессе также принимает участие ряд следующих белковых факторов: XPC-hHR23B, TFIIH, XPA, XPE, XPG и ERCC1-XPF [106]. Схема этого процесса показана на рис. 9. Системой эксцизионной репарации нуклеотидов из ДНК удаляются объемные повреждения, возникающие под действием облучения УФ-светом или экзогенных факторов окружающей среды.

Система NER обладает необычайно широкой субстратной специфичностью. Одним из главных кандидатов на роль фактора, обеспечивающего первоначальное узнавание повреждений ДНК в процессе NER, является комплекс XPC-hHR23B [107, 108]. Механизм взаимодействия этого белкового фактора с поврежденной ДНК интенсивно исследуется [106]. XPC-hHR23B привлекает на сайт повреждения комплекс TFIIH. Этот фактор с участием АТФ и двух субъединиц, обладающих хеликазной активностью (XPD и XPB), разворачивает ДНК-дуплекс в месте повреждения. Затем RPA, XPA и XPG образуют комплекс, предшествующий выщеплению участка ДНК, несущего повреждение. На следующей стадии эндонуклеазы ERCC1-XPF и XPG выщепляют поврежденный участок однострочной ДНК размером в 30 нт, проводя гидролиз с 5'- и с 3'-концов ДНК, соответственно. Репликативный белок А остается связанным с однострочной ДНК и облегчает переход к стадии синтеза ДНК для заполнения бреши, который катализируется ДНК-полимеразой дельта с участием RFC и PCNA. Таким образом, RPA прежде всего важен для формирования мультикомпонентного белкового комплекса с ДНК перед стадией выщепления из поврежденной цепи ДНК участка в 30 нуклеотидных остатков, содержащего повреждение (см. рис. 9) [106]. Именно на этой стадии процесса NER оказывается важной способностью RPA «полярно» связываться с неповрежденной цепью ДНК-дуплекса. «Асимметрия» в расположении различных ДНК-связывающих доменов RPA (p70A, p70B, p70C и p32D) на неповрежденной цепи позволяет создать различные структурные особенности с 5'- и 3'-концов в «раскрытом» ДНК-дуплексе перед стадией выщепления поврежденного участка комплементарной цепи размером в 30 нуклеотидных остатков. Это, в свою очередь, определяет точную ориентацию и стимуляцию активности эндонуклеаз XPG, катализирующей расщепление с

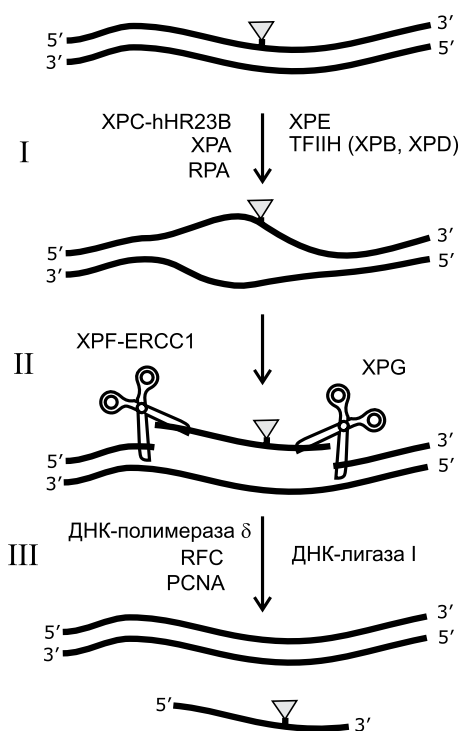


Рис. 9. Схема эксцизионной репарации нуклеотидов (NER) [109].

I – узнавание повреждения и формирование открытого комплекса; II – вырезание поврежденного участка; III – ресинтез ДНК. Повреждение ДНК, удаляемое системой NER, схематически показано серым треугольником.

На рисунке приведены обозначения ферментов и белковых факторов, участвующих в процессе.

3'-конца выщепляемого фрагмента, и ERCC1–XPF, расщепляющей ДНК с 5'-конца. RPA безусловно важен в этом процессе и на этапе репарационного синтеза ДНК в образованной бреше, который катализирует ДНК-полимераза дельта, поддерживаемая RFC и PCNA. Кроме того, до настоящего времени вопрос о влиянии RPA на узнавание повреждений с помощью XPC-hHR23B и их дальнейший процессинг однозначно не решен и является предметом интенсивного изучения [110–114].

Не исключено, что далеко не все функции SSB-белков уже открыты. Сравнительно недавно было установлено, что репликативный белок А присутствует на теломерных концах хромосом с максимальным уров-

нем ассоциации с теломерными концами в S-фазе. RPA играет важную роль в процессинге теломеров, обеспечивая доступ к теломерным концам важнейшего компонента теломеразного комплекса – белка Est1p [115, 116]. По-видимому, RPA способствует стабилизации одноцепочечной формы ДНК, которая взаимодействует с компонентами теломеразного комплекса. Один из возможных механизмов участия RPA в активации теломеразной активности связан с его способностью дестабилизировать сложные структуры ДНК, например такие, как богатые остатками гуанозина G-квадруплексы [117, 118]. Интересно, что в процессе разворачивания таких структур ДНК важнейшую роль играет переход между различными формами связывания RPA с ДНК. Детальный механизм взаимодействия RPA с теломеразным комплексом представляет значительный интерес.

## V. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Участие репликативного белка А в ключевых процессах метаболизма ДНК сделали его объектом всестороннего исследования. Универсальная роль SSB-белков в метаболизме ДНК подтверждается наличием общих структурных мотивов в белках эволюционно далеких друг от друга организмов. Дальнейшее углубленное изучение роли отдельных доменов RPA в формировании их комплексов с различными структурами ДНК представляет несомненный интерес для понимания механизма белково-нуклеиновых взаимодействий в функциональных комплексах, осуществляющих процессинг ДНК в ходе жизнедеятельности клетки.

Авторы выражают благодарность к.б.н. С.Н. Ходыревой и д.х.н. Г.Г. Карповой за обсуждение материалов в процессе подготовки данной статьи.

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Wold, M.S.* (1997) *Annu. Rev. Biochem.*, **66**, 61–92.
2. *Lohman, T.M., Ferrari M.E.* (1994) *Annu. Rev. Biochem.*, **63**, 527–570.
3. *Cha, T.A., Alberts, B.M.* (1989) *J. Biol. Chem.*, **264**, 12220–12225.
4. *Kim, Y.T., Richardson, C.C.*, (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 10173–10177.
5. *Perales, C., Cava, F., Meijer, W.J.J.* (2003) *Nucleic Acids Res.*, **31**, 6473–6380.
6. *Chase, J.W., Williams, K.R.* (1986) *Annu. Rev. Biochem.*, **55**, 103–136.
7. *Zou, Y., Liu, Y., Wu, X., Shell, S.M.* (2006) *J. Cell. Physiol.*, **208**, 267–273.
8. *Stein, G.S., Zaidi, S.K., Braastad, C.D., Montecino, M., van Wijnen, A.J., Choi, J.Y., Stein, J.L., Lian, J.B., Javed, A.* (2003) *Trends Cell. Biol.*, **13**, 584–592.
9. *Davey, M.J., O'Donnell, M.* (2000) *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **4**, 581–586.

10. Kur, J., Olszewski, M., Dlugolecka, A., Filipkowski, P. (2005) *Acta Biochim. Pol.*, **52**, 569–574.
11. Yuzhakov, A., Kelman, Z., Hurwitz, J., O'Donnell, M. (1999) *EMBO J.*, **18**, 6189–6199.
12. Maga, G., Stucki, M., Spadari, S., Hubscher, U. (2000) *J. Mol. Biol.*, **295**, 791–801.
13. Carty, M.P., Levine, A.S., Dixon, K. (1992) *Mutat. Res.*, **274**, 29–34.
14. Maga, G., Frouin, I., Spadari, S., Hubscher, U. (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 18235–18242.
15. Robbins, J.B., Murphy, M.C., White, B.A., Mackie, R.I., Ha, T., Cann, I.K. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 6315–6326.
16. Cann, I.K., Ishino, S., Yuasa, M., Daiyasu, H., Toh, H., Ishino, Y. (2001) *J. Bacteriol.*, **183**, 2614–2623.
17. Robbins, J.B., McKinney, M.C., Guzman, C.E., Sriratana, B., Fitz-Gibbon, S., Ha, T., Cann, I.K. (2005) *J. Biol. Chem.*, **280**, 15325–15339.
18. Kelman, Z., Pietrokovski, S., Hurwitz, J. (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**, 28751–28761.
19. Stauffer, M.E., Chazin, W.J. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 30915–30918.
20. Benkovic, S.J., Valentine, A.M., Salinas, F. (2001) *Annu. Rev. Biochem.*, **70**, 181–208.
21. Хлиманков Д.Ю., Речкунова Н.А., Лаврик О.И. (2004) *Биохимия*, **69**, 311–327.
22. Rademakers, S., Volker, M., Hoogstraaten, D., Nigg, A.L., Mone, M.J., Van Zeeland, A.A., Hoeijmakers, J.H., Houtsmuller, A.B., Vermeulen, W. (2003) *Mol. Cell. Biol.*, **23**, 5755–5767.
23. Essers, J., Houtsmuller, A.B., van Veelen, L., Paulusma, C., Nigg, A.L., Pastink, A., Vermeulen, W., Hoeijmakers, J.H., Kanaar, R. (2002) *EMBO J.*, **21**, 2030–2037.
24. Arunkumar, A.I., Stauffer, M.E., Bochkareva, E., Bochkarev, A., Chazin, W.J. (2003) *J. Biol. Chem.*, **17**, 41077–41082.
25. Murzin, A.G., Brenner, S.E., Hubbard, T., Chothia, C. (1995) *J. Mol. Biol.*, **247**, 536–540.
26. Murzin, A.G. (1993) *EMBO J.*, **12**, 861–867.
27. Theobald, D.L., Mitton-Fry, R.M., Wuttke, D.S. (2003) *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **32**, 115–133.
28. Williams, K.R., Spicer, E.K., LoPresti, M.B., Guggenheimer, R.A., Chase, J.W. (1983) *J. Biol. Chem.*, **258**, 3346–3355.
29. Carlini, L., Curth, U., Kindler, B., Urbanke, C., Porter, R.D. (1998) *FEBS Lett.*, **430**, 197–200.
30. Iftode, C., Daniely, Y., Borowiec, J.A. (1999) *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, **34**, 141–180.
31. Bochkareva, E., Korolev, S., Lees-Miller, S.P., Bochkarev, A. (2002) *EMBO J.*, **21**, 1855–1863.
32. Daughdrill, G.W., Buchko, G.W., Botuyan, M.V., Arrowsmith, C., Wold, M.S., Kennedy, M.A., Lowry, D.F. (2003) *Nucleic Acids Res.*, **31**, 4176–4183.
33. Weisshart, K., Taneja, P., Fanning, E. (1998) *J. Virol.*, **72**, 9771–9781.
34. Golub, E.I., Gupta, R.C., Haaf, T., Wold, M.S., Radding, C.M. (1998) *Nucleic Acids Res.*, **26**, 5388–5393.
35. Bochkareva, E., Kaustov, L., Ayed, A., Yi, G.S., Lu, Y., Pineda-Lucena, A., Liao, J.C., Okorokov, A.L., Milner, J., Arrowsmith, C.H., Bochkarev, A. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 15412–15417.
36. Daughdrill, G.W., Ackerman, J., Isern, N.G., Botuyan, M.V., Arrowsmith, C., Wold, M.S., Lowry, D.F. (2001) *Nucleic Acids Res.*, **29**, 3270–3276.
37. He, Z., Brinton, B.T., Greenblatt, J., Hassell, J.A., Ingles, C.J. (1993) *Cell*, **73**, 1223–1232.
38. Mer, G., Bochkarev, A., Gupta, R., Bochkareva, E., Frappier, L., Ingles,

- C.J., Edwards, A.M., Chazin, W.J.* (2000) *Cell*, **103**, 449–456.
39. *Gajiwala, K.S., Burley, S.K.* (2000) *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **10**, 110–116.
40. *Braun, K.A., Lao, Y., He, Z., Ingles, C.J., Wold, M.S.* (1997) *Biochemistry*, **36**, 8443–8454.
41. *Stauffer, M.E., Chazin, W.J.* (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 25638–25645.
42. *Kelly, T.J., Simancek, P., Brush, G.S.* (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 14634–14639.
43. *Philipova, D., Mullen, J.R., Maniar, H.S., Lu, J., Gu, C., Brill, S.J.* (1996) *Genes Dev.*, **10**, 2222–2233.
44. *de Vries, J., Wackernagel, W.* (1993) *Gene*, **127**, 39–45.
45. *Genschel, J., Litz, L., Thole, H., Roemling, U., Urbanke, C.* (1996) *Gene*, **182**, 137–143.
46. *Purnapatre, K., Varshney, U.* (1999) *Eur. J. Biochem.*, **264**, 591–598.
47. *Sancar, A., Williams, K., Chase, J., Rupp, W.* (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 4274–4278.
48. *Weiner, J.H., Bertsch, L.L., Kornberg, A.* (1975) *J. Biol. Chem.*, **250**, 1972–1980.
49. *Webster, G., Genschel, J., Curth, U., Urbanke, C., Kang, C., Hilgenfeld, R.* (1997) *FEBS Lett.*, **411**, 313–316.
50. *Yang, C., Curth, U., Urbanke, C., Kang, C.-H.* (1997) *Nat. Struct. Biol.*, **4**, 153–157.
51. *Curth, U., Urbanke, C., Greipel, J., Gerberding, H., Tiranti, V., Zeviani, M.* (1994) *Eur. J. Biochem.*, **221**, 435–443.
52. *Dabrowski, S., Olszewski, M., Piatek, R., Brillowska-Dabrowska, A., Konopa, G., Kur, J.* (2002) *Microbiology*, **148**, 3307–3315.
53. *Eggington, J.M., Haruta, N., Wood, E.A., Cox, M.M.* (2004) *BMC Microbiol.*, **4**, 2.
54. *Witte, G., Urbanke, C., Curth, U.* (2005) *Nucleic Acids Res.*, **33**, 1662–1670.
55. *Bernstein, D.A., Eggington, J.M., Killoran, M.P., Mistic, A.M., Cox, M.M., Keck, J.L.* (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 8575–8580.
56. *Bochkarev, A., Pfuetzner, R.A., Edwards, A.M., Frappier, L.* (1997) *Nature*, **385**, 176–181.
57. *Lin, Y., Robbins, J.B., Nyannor, E.K., Chen, Y.H., Cann, I.K.* (2005) *J. Bacteriol.*, **187**, 7881–7889.
58. *Lin, Y.L., Shivji, K.K., Chen, C., Kolodner, R., Wood, R.D., Dutta, A.* (1998) *J. Biol. Chem.*, **273**, 1453–1461.
59. *Bochkareva, E., Frappier, L., Edwards, A.M., Bochkarev, A.* (1998) *J. Biol. Chem.*, **273**, 3932–3936.
60. *Bochkarev, A., Bochkareva, E., Frappier, L., Edwards, A.M.* (1999) *EMBO J.*, **18**, 4498–4504.
61. *Chedin, F., Seitz, E.M., Kowalczykowski, S.C.* (1998) *Trends Biochem. Sci.*, **23**, 273–277.
62. *Kerr, I.D., Wadsworth, R.I., Cubeddu, L., Blankenfeldt, W., Naismith, J.H., White, M.F.* (2003) *EMBO J.*, **22**, 2561–2570.
63. *Wadsworth, R.I., White, M.F.* (2001) *Nucleic Acids Res.*, **29**, 914–920.
64. *Bochkarev, A., Bochkareva, E.* (2004) *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **14**, 36–42.
65. *Raghunathan, S., Ricard, C.S., Lohman, T.M., Waksman, G.* (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 6652–6657.
66. *Raghunathan, S., Kozlov, A.G., Lohman, T.M., Waksman, G.* (2000) *Nat. Struct. Biol.*, **7**, 648–652.
67. *Antson, A.A.* (2000) *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **10**, 87–94.
68. *Berman, H.M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T.N., Weissig, H., Shindyalov, I.N., Bourne, P.E.* (2000) *Nucleic Acids Res.*, **28**, 235–242.
69. *Carter, A.P., Clemons, W.M.Jr., Brodersen, D.E., Morgan-Warren, R.J., Hartsch, T., Wimberly, B.T., Rama-*

- krishnan, V.* (2001) *Science*, **291**, 498–501.
70. *Bochkareva, E., Belegu, V., Korolev, S., Bochkarev, A.* (2001) *EMBO J.*, **20**, 612–618.
71. *Bogden, C.E., Fass, D., Bergman, N., Nichols, M.D., Berger, J.M.* (1999) *Mol. Cell*, **3**, 487–493.
72. *Peersen, O.B., Ruggles, J.A., Schultz, S.C.* (2002) *Nat. Struct. Biol.*, **9**, 182–187.
73. *Savvides, S.N., Raghunathan, S., Futterer, K., Kozlov, A.G., Lohman, T.M., Waksman, G.* (2004) *Protein Sci.*, **13**, 1942–1947.
74. *Grishin, N.V.* (2001) *Nucleic Acids Res.*, **29**, 1703–1714.
75. *Matthews, J.M., Sunde, M.* (2002) *IUBMB Life*, **54**, 351–355.
76. *Krishna, S.S., Majumdar, I., Grishin, N.V.* (2003) *Nucleic Acids Res.*, **31**, 532–550.
77. *Lachenmann, M.J., Ladbury, J.E., Dong, J., Huang, K., Carey, P., Weiss, M.A.* (2004) *Biochemistry*, **43**, 13910–13925.
78. *Park, J.S., Wang, M., Park, S.J., Lee, S.H.* (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**, 29075–29080.
79. *Komori, K., Ishino, Y.* (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 25654–25660.
80. *Bochkareva, E., Korolev, S., Bochkarev, A.* (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**, 27332–27338.
81. *Bujalowski, W., Overman, L.B., Lohman, T.M.* (1988) *J. Biol. Chem.*, **163**, 4629–4640.
82. *Kozlov, A.G., Lohman, T.M.* (2002) *Biochemistry*, **41**, 11611–11627.
83. *Bastin-Shanower, S.A., Brill, S.J.* (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 36446–36453.
84. *Lavrik, O.I., Kolpashchikov, D.M., Weisshart, K., Nasheuer, H.P., Khodyreva, S.N., Favre, A.* (1999) *Nucleic Acids Res.*, **27**, 4235–4240.
85. *Gomes, X.V., Henricksen, L.A., Wold, M.S.* (1996) *Biochemistry*, **35**, 5586–5595.
86. *Pestryakov, P.E., Weisshart, K., Schlott, B., Khodyreva, S.N., Kremmer, E., Grosse, F., Lavrik, O.I., Nasheuer, H.-P.* (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 17515–17524.
87. *Пестряков, П.Е., Красикова, Ю.С., Петрусева, И.О., Ходырева, С.Н., Лаврик, О.И.* (2007) *Докл. АН.*, **412**, 118–122.
88. *de Laat, W.L., Appeldoorn, E., Sugawara, K., Weterings, E., Jaspers, N.G., Hoeijmakers, J.H.* (1998) *Genes Dev.*, **12**, 2598–2609.
89. *Treuner, K., Ramsperger, U., Knippers, R.J.* (1996) *Mol. Biol.*, **259**, 104–112.
90. *Blackwell, L.J., Borowiec, J.A., Masrangelo, I.A.* (1996) *Mol. Cell. Biol.*, **16**, 4798–4807.
91. *Lohman, T.M., Overman, L.B.* (1985) *J. Biol. Chem.*, **260**, 3594–3603.
92. *Kim, C., Wold, M.S.* (1995) *Biochemistry*, **34**, 2058–2064.
93. *Brill, S.J., Stillman, B.* (1991) *Genes Dev.*, **5**, 1589–1600.
94. *Heyer, W.-D., Rao, M.R.S., Erdile, L.F., Kelly, T.J., Kolodner, R.D.* (1990) *EMBO J.*, **9**, 2321–2329.
95. *Kolpashchikov, D.M., Khodyreva, S.N., Khlimankov, D.Y., Wold, M.S., Favre, A., Lavrik, O.I.* (2001) *Nucleic Acids Res.*, **29**, 373–379.
96. *Pestryakov, P.E., Khlimankov, D.Yu., Bochkareva, E., Bochkarev, A., Lavrik, O.I.* (2004) *Nucleic Acids Res.*, **32**, 1894–1903.
97. *Weisshart, K., Pestryakov, P., Smith, R.W., Hartmann, H., Kremmer, E., Lavrik, O., Nasheuer, H.-P.* (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 35368–35376.
98. *Lohman, T.M., Bujalowski, W.* (1994) *Biochemistry*, **33**, 6167–6176.
99. *Fanning, E., Klimovich, V., Nager, A.R.* (2006) *Nucleic Acids Res.*, **34**, 4126–4137.

100. Mass, G., Nethanel, T., Kaufmann, G. (1998) *Mol. Cell Biol.*, **18**, 6399–6407.
101. Mass, G., Nethanel, T., Lavrik, O.I., Wold, M.S., Kaufmann, G. (2001) *Nucleic Acids Res.*, **29**, 3892–3899.
102. Красикова, Ю.С., Белоусова, Е.А., Лебедева, Н.А., Пестряков, П.Е., Лаврик, О.И. (2008) *Биохимия*, принята в печать.
103. Maga, G., Shevelev, I., Villani, G., Spadari, S., Hubscher, U. (2006) *Nucleic Acids Res.*, **34**, 1405–1415.
104. Maga, G., Villani, G., Crespan, E., Wimmer, U., Ferrari, E., Bertocci, B., Hubscher, U. (2007) *Nature*, **447**, 606–608.
105. Crespan, E., Hubscher, U., Maga, G. (2007) *Nucleic Acids Res.*, **35**, 5173–5181.
106. Gillet, L., Scharer, O. (2006) *Chem. Rev.*, **106**, 253–276.
107. Sugasawa, K., Ng, J.M., Masutani, C., Iwai, S., van der Spek, P.J., Eker, A.P., Hanaoka, F., Bootsma, D., Hoeijmakers, J.H. (1998) *Mol. Cell.*, **2**, 223–232.
108. Völker, M., Mone, M.J., Karmakar, P., van Hoffen, A., Schul, W., Vermeulen, W., Hoeijmakers, J.H., van Driel, R., van Zeeland, A.A., Mullenders, L.H. (2001) *Mol. Cell.*, **8**, 213–224.
109. Речкунова Н.И., Мальцева Е.А., Лаврик О.И. (2008) *Молекуляр. биология*, **42**, 24–31.
110. Patrick, S.M., Turchi, J.J. (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**, 14972–14978.
111. Missura, M., Buterin, T., Hindges, R., Hubscher, U., Kasparkova, J., Brabec, V., Naegeli, H. (2001) *EMBO J.*, **20**, 3554–3564.
112. Reardon, J.T., Sancar, A. (2002) *Mol. Cell Biol.*, **22**, 5938–5945.
113. Patrick, S.M., Turchi, J.J. (1998) *Biochemistry*, **37**, 8808–8815.
114. Shuck, S.C., Short, E.A., Turchi, J.J. (2008) *Cell Res.*, **18**, 64–72.
115. Smith, J., Zou, H., Rothstein, R. (2000) *Biochimie*, **82**, 71–78.
116. Schramke, V., Luciano, P., Brevet, V., Guillot, S., Corda, Y., Longhese, M.P., Gilson, E., Geli, V. (2004) *Nat. Genet.*, **36**, 46–54.
117. Cohen, S., Jacob, E., Manor, H. (2004) *Biochim. Biophys. Acta.*, **1679**, 129–140.
118. Salas, T.R., Petruseva, I., Lavrik, O., Bourdoncle, A., Mergny, J.L., Favre, A., Saintome, C. (2006) *Nucleic Acids Res.*, **34**, 4857–4865.