

УДК 577.213.6

Современные представления о структурно-функциональной организации системы репарации неканонических пар нуклеотидов в ДНК

С. А. Перевозчикова¹, Е. А. Романова¹, Т. С. Орецкая^{1,2}, П. Фридрихс³, Е. А. Кубарева^{1*}¹Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 40²Химический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 3³Институт биохимии, FB 08, Университет Ю. Либиха, D-35392 Гиссен, Германия, Heinrich-Buff-Ring, 58

*E-mail: kubareva@belozersky.msu.ru

Поступила в редакцию 21.05.2013

РЕФЕРАТ В обзоре приведены общие представления о репарации неканонических пар нуклеотидов («мисматчей») в ДНК (MMR). На сегодняшний день определены основные структурные и функциональные характеристики ключевых белков этой системы: MutS и MutL. Тем не менее взгляды на начальные этапы MMR с участием этих белков все еще противоречивы. Обобщены данные о взаимосвязи двух основных функций MutS – АТФ-азной и ДНК-связывающей, систематизированы модели координации между участком узнавания и участком гидролиза ДНК в системе MMR. Для проверки существующих моделей необходимо развитие методов фиксации короткоживущих комплексов, возникающих на различных этапах MMR.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА система репарации неканонических пар нуклеотидов в ДНК (MMR), MutS, MutL, MutH, структура белков, ДНК-белковые взаимодействия.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ HNPCC – наследственный неполипозный рак толстой кишки (синдром Линча); НТН – спираль-поворот-спираль; IDL – инсерционно-делеционная петля; IRC – «начальный» узнающий комплекс; m⁶A – N⁶-метил-2'-дезоксаденозин; MMR – система репарации неканонических пар нуклеотидов («мисматчей») в ДНК; PCNA – ядерный антиген пролиферирующих клеток; SSB-белок – белок, связывающий одноцепочечную ДНК; URC – «окончательный» узнающий комплекс; а.о. – аминокислотный остаток; п.н. – пара нуклеотидов.

ВВЕДЕНИЕ

Геном является основным хранителем информации, необходимой для жизни любого организма. Воспроизведение генетического материала в неизменном виде при соматическом и генеративном делении клеток – важнейшее условие существования и поддержания жизнеспособности организмов. Одна нуклеотидная замена в единственном гене может привести к нарушениям развития и даже к летальному эффекту при возникновении в репродуктивных клетках [1] или к канцерогенезу при мутациях в соматических клетках [2]. В ходе репликации, несмотря на корректирующую активность ДНК-полимераз, возникают ошибки. По существующим оценкам при репликации бактериальной полимеразой ДНК длиной 10^8 – 10^{10} нуклеотидов

возникает в среднем одна нуклеотидная замена [3]. Эукариотические ДНК-полимеразы не обладают 3' → 5'-экзонуклеазной активностью, что обуславливает большую частоту ошибок [4], поэтому очевидна необходимость существования систем репарации неправильно встроенных нуклеотидов, позволяющих предотвратить возникновение мутаций. В настоящее время можно выделить от пяти до девяти систем исправления повреждений, среди которых активно изучаются механизмы прямой репарации, эксцизионной, пострепликативной и SOS-репарации [5, 6]. В поддержании стабильности генома важную роль выполняет также система репарации неканонических пар нуклеотидов («мисматчей») в ДНК (MMR, от англ. mismatch repair).

Актуальность исследования проблем поддержания генетической стабильности подтверждает и большое количество экспериментальных и обзорных статей. Ежегодно в предпоследнем номере журнала *Science* обсуждается важнейшее достижение года. В 1994 году это были работы по репарации ДНК [7]. Первый номер журнала «Биохимия» за 2011 год [8] посвящен механизмам систем репарации повреждений в ДНК. В представленном обзоре рассмотрена система репарации неканонических пар нуклеотидов в ДНК. За последние полтора десятилетия репарации «мисматчей» посвящено значительное количество обзорных работ [9–17]. Нами рассмотрены экспериментальные данные, полученные в том числе за последние 5–6 лет, и сделана попытка систематизировать представления о механизмах функционирования системы MMR.

РОЛЬ СИСТЕМЫ MMR В БИОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССАХ

Неканоническими парами нуклеотидов, или «мисматчами», считаются все пары нуклеотидов, кроме G/C и A/T. К их появлению приводят ошибочное встраивание нуклеотидов ДНК-полимеразой при копировании матричной цепи, а также воздействие мутагенных факторов (в том числе свободных радикалов и ионизирующей радиации). Возможно встраивание модифицированных нуклеотидов ДНК-полимеразой или немодифицированного нуклеотида напротив поврежденного основания в матричной цепи [5, 18]. Другая распространенная ошибка системы репликации – короткие инсерционные и делеционные петли (IDL), которые возникают также при образовании дуплексов в ходе гомологической рекомбинации [19, 20]. Перечисленные повреждения узнаются и восстанавливаются системой репарации неканонических пар нуклеотидов (MMR), понижая тем самым вероятность возникновения мутаций в 50–1000 раз [21, 22]. Система MMR участвует в восстановлении ДНК после некоторых химических модификаций. Показана репарация следующих повреждений: O⁶-метилгуанозина [23, 24], 8-оксогуанозина [25, 26], аддуктов, образующихся при воздействии на ДНК канцерогенов [27], фотоиндуцированных продуктов [28–30] и продуктов реакции ДНК с производными цисплатина [31].

Роль системы MMR не ограничивается репарацией указанных повреждений ДНК. Белки этой системы принимают участие в регуляции клеточного цикла. В частности, в фазе G₂ сигнал о повреждении ДНК, передаваемый белком MutS, запускает каскад процессов, вызывающих запрограммированную гибель клеток (апоптоз) [15, 32, 33]. Нарушение этой функции приводит к повышенной выживаемости клеток, лежащей в основе канцерогенеза, а также к их устой-

чивости к химиотерапии [13, 25]. Аналогично этому дефекты системы репарации «мисматчей» у прокариот приводят к повышению скорости мутагенеза и к межвидовой передаче генов, что может обеспечить приспособляемость бактерий к условиям стресса и действию антибиотиков [34].

Система MMR важна для поддержания длины микросателлитных повторов, т.е. коротких повторяющихся ДНК [13, 35, 36]. Репликация повторяющихся участков часто приводит к ошибкам из-за «соскальзывания» полимеразы на аналогичную последовательность. Так как основное бремя репарации этих повреждений лежит именно на системе MMR, нестабильность микросателлитов используется в качестве биомаркера нарушения функции белков этой системы репарации. При дисфункции системы MMR возникают различные перестройки ДНК и независимое от теломеразы удлинение теломер [37, 38].

Белки системы MMR важны для предотвращения рекомбинации между сходными, но не идентичными последовательностями ДНК, а также для спаривания хромосом в мейозе и сегрегации хромосом [39]. В соматических клетках MMR участвует в гипермутировании при формировании репертуара иммуноглобулинов в В-лимфоцитах [40, 41]. Большое разнообразие биологических функций системы репарации «мисматчей» вызывает интерес к деталям ее функционирования.

Система репарации «мисматчей» обнаружена во всех царствах живых организмов, она характеризуется высокой консервативностью ключевых белков – MutS и MutL, от бактерий до высших эукариот [42]. Учитывая структурное сходство белков, предполагается, что и основы механизма репарации «мисматчей» сходны у всех организмов. Дефекты белков системы MMR у человека приводят к возникновению опухолей, в том числе и злокачественных. Наиболее распространен среди них синдром Линча, или непוליпозный рак толстой кишки (HNPCC – hereditary nonpolyposis colon cancer), смертность от которого занимает третье место среди онкологических заболеваний [43–46]. В 85% случаев наследственного непוליпозного рака толстой кишки [44] и 15–25% спорадических опухолей различных тканей [47] находят мутации в генах белков системы MMR. Выявление нарушений в системе MMR играет важную роль при диагностике опухолей [48]. Существование связи между онкологическими заболеваниями человека и MMR определяет актуальность изучения системы репарации «мисматчей» в ДНК.

Процесс репарации MMR был воспроизведен *in vitro* с использованием очищенных компонентов еще в 1989 году [49], и на сегодняшний день уже сформировано общее представление о функционировании

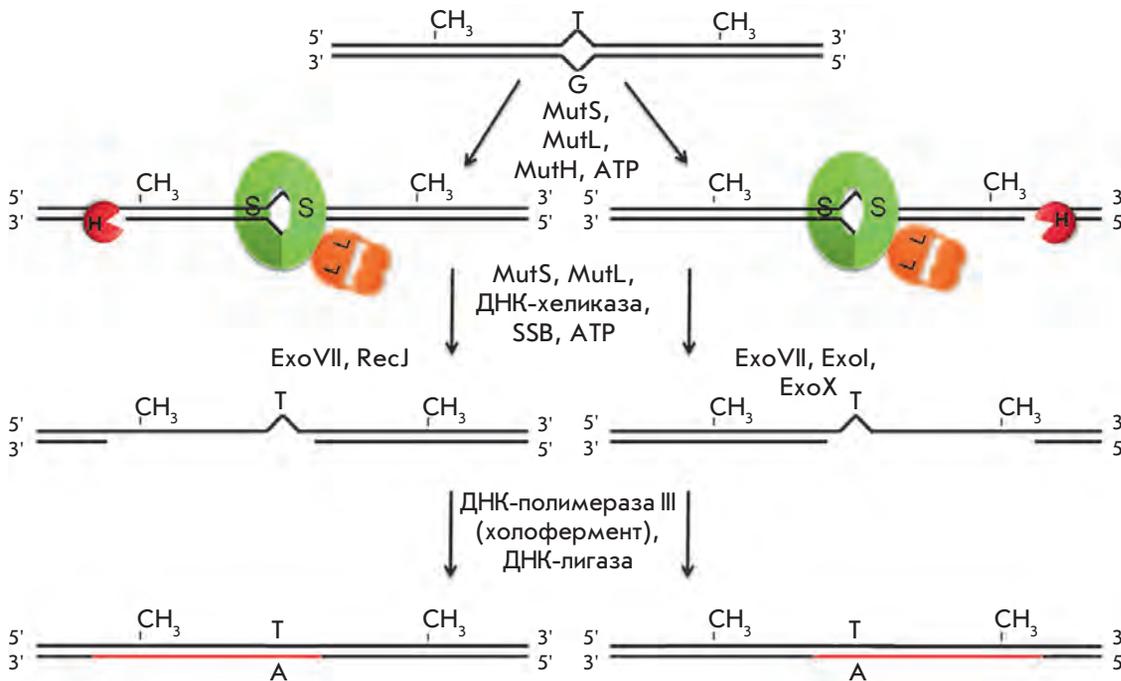


Рис. 1. Схема процесса репарации «мисматчей» в ДНК у *E. coli*

системы MMR. Однако для создания адекватной модели MMR необходимо решить много вопросов. Ниже будут рассмотрены основные взгляды на механизм функционирования MMR.

ОБЩЕЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЕ О МЕХАНИЗМЕ И ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ СОБЫТИЙ В ПРОЦЕССЕ MMR

Ключевыми белками системы MMR являются MutS и MutL. Гены этих белков первоначально обнаружили в бактериях *Streptococcus pneumoniae* (гены *hexA* и *hexB*) [50]. Немного позднее гомологичные гены обнаружили в *Escherichia coli* (ген *mutS*, гомолог *hexA*, и ген *mutL*, гомолог *hexB*, а также *mutH* и *mutU*) [51]. Белки системы MMR были названы Mut (сокращенное от mutagenic), так как нарушение их функции приводит к гипермутабильности микроорганизмов. Гены белков, гомологичных MutS и MutL, обнаружены в большинстве геномов с известной нуклеотидной последовательностью. Названия гомологов MutS и MutL образуются с использованием сокращений MSH (от MutS homolog) и MLH (от MutL homolog) соответственно.

Система MMR является поликомпонентной. Ее функционирование обусловлено координированным действием более 10 белков [52]. В табл. 1 приведены ключевые белки системы MMR *E. coli* и человека и сравнение их функций.

Общая схема репарации «мисматчей» у *E. coli* представлена на рис. 1. Белок MutS действует

как сенсор, сканирующий ДНК в поисках неканонических пар нуклеотидов: G/T, C/T, A/C, A/G, G/G, A/A, T/T (всех, кроме C/C) и небольших инсерционно-делеционных петель (IDL) [14]. За последние годы показано, что MutS также стимулирует ответ клеток млекопитающих на повреждающие агенты, такие, как цисплатин, ионизирующая радиация, антимаболиты, ультрафиолетовое излучение, интеркалирующие и алкилирующие агенты [24–31, 53, 54]. MutS образует с «мисматчем» специфические контакты в так называемом «начальном» узнающем комплексе (англ. initial recognition complex, IRC), характеризующемся изгибом ДНК на 60° [13, 55]. Затем белок MutS взаимодействует с MutL, образуя тройной комплекс, которому приписывают способность координировать дальнейшие процессы вплоть до различения материнской и дочерней (т.е. содержащей ошибку) цепей ДНК. MutS и MutL – это АТФ-азы: для их функционирования требуется присутствие АДФ и АТФ [13, 14].

Важную роль в различении материнской и дочерней цепей ДНК у энтеробактерий играет отсутствие метилирования во вновь синтезированной цепи. Поэтому систему репарации «мисматчей» у таких бактерий называют направленной метилированием системой репарации «мисматчей» (methyl-directed repair system). Эта зависимость была открыта Мезелсоном и соавт. [56, 57], которые исследовали репарацию бактериофага λ, несущего один или несколько «мисматчей», при трансфекции его в штаммы *E. coli*. Оказалось,

Таблица 1. Ключевые белки системы репарации «мисматчей» *E. coli* и человека

<i>E. coli</i>	Функция	Гомолог в клетках человека	Функция
MutS (гомодимер)	Узнавание «мисматчей»	MSH2–MSH6 (MutS α)	Репарация «мисматчей» и инсерционно-делеционных петель из 1–2 нуклеотидов
		MSH2–MSH3 (MutS β)	Репарация инсерционно-делеционных петель из двух и более нуклеотидов
		MSH4–MSH5	Участие в мейотической рекомбинации и в порядке переключения синтеза иммуноглобулинов
MutL (гомодимер)	Координирование процессов MMR после узнавания «мисматча» и до репарационного биосинтеза ДНК	MLH1–PMS2 (MutL α)	Как у MutL из <i>E. coli</i>
		MLH1–PMS1 (MutL β)	В дрожжевых гомологах подавление инсерционно-делеционного мутагенеза; функция человеческого гомолога в MMR неясна
		MLH1–MLH3 (MutL γ)	Подавление инсерционно-делеционного мутагенеза, участие в мейотической рекомбинации
MutH	Узнавание последовательности 5'-Gm ⁶ ATC-3'/3'-СТАG \downarrow -5' и гидролиз дочерней, неметилированной цепи ДНК	Не обнаружено	

что репарация близко расположенных «мисматчей» происходит в одной и той же цепи ДНК [56]. При выборе цепи ДНК для внесения разрыва и последующей эксцизионной репарации важно участие белка MutH, ДНК-никазы, узнающей монометилированную последовательность 5'-Gm⁶ATC-3'/3'-СТАG \downarrow -5' (где m⁶A – N6-метил-2'-дезоксаденозин; стрелкой указано место гидролиза). Возникновение участков узнавания MutH связано с действием клеточной Dam-метилтрансферазы. Перед началом репликации ДНК остатки аденозина обеих цепей всех последовательностей 5'-GATC-3' в клетке метилированы. Однако в течение некоторого времени после репликации клетка содержит пул ДНК, метилированных только по одной из двух цепей [58]. MutH катализирует одноцепочечный разрыв в неметилированной, т.е. вновь синтезированной цепи ДНК [16, 59]. Полностью метилированная ДНК в клетках *E. coli* не репарируется [60], а при отсутствии метилирования (штаммы *dam*⁻) различить материнскую и дочернюю цепи невозможно, что может привести к возникновению двухцепочечных разрывов ДНК. Поэтому в штаммах *E. coli*, имеющих как недостаточно, так и избыточно активную метилтрансферазу Dam, повышена частота мутаций [61, 62]. Каталитическая функция MutH стимулируется тройным комплексом, состоящим из белков MutS и MutL и ДНК с «мисматчем». Обычно активируется MutH, связанная со своим участком узнавания и расположенная наиболее близко к неканонической паре нуклеотидов с любой стороны ДНК относительно «мисматча». Расстояние от «мисматча» до места гидролиза может достигать 2000 п.н. [14, 63].

В клетках большинства организмов репарация «мисматчей» осуществляется независимо от метилирования ДНК. Вопрос о том, каким образом система репарации выявляет дочернюю, т.е. содержащую ошибку цепь, остается открытым. Введение разрыва в ДНК в таких организмах приписывают гомологам MutL, у которых обнаружен эндонуклеазный мотив [64], тем не менее экспериментально этот факт не подтвержден. Другое предположение состоит в том, что сигналами вновь синтезированной цепи ДНК могут быть одноцепочечные разрывы, образующиеся в процессе репликации ДНК: с 3'-конца лидирующей цепи и как с 3'-, так и с 5'- концев отстающей цепи [65].

Одноцепочечный разрыв служит сигналом для эксцизионной репарации, при которой удаляется фрагмент цепи ДНК, содержащей «мисматч». К ДНК в месте разрыва присоединяется ДНК-хеликаза UvrD, которая расплетает ДНК до неканонической пары нуклеотидов. Показано, что действие ДНК-хеликазы стимулируется тройным комплексом MutS–MutL–ДНК, и ДНК расплетается в направлении «мисматча» [66–68]. Последнее косвенно указывает на способность тройного комплекса координировать узнавание «мисматча» и последующую эксцизионную репарацию. Высвобожденную одноцепочечную ДНК гидролизует определенный набор экзонуклеаз в зависимости от того, 5'- или 3'-конец доступен [69, 70]. С материнской цепью ДНК при этом связываются субъединицы белка, проявляющего сродство к одноцепочечным участкам – SSB (от англ. single-strand binding protein), покрывая всю ее поверхность и предотвращая деградацию [71, 72]. Образовавшуюся

юся брешь застраивает ДНК-полимераза III (холофермент). ДНК-лигаза восстанавливает целостность исправленной цепи.

MutS КАК КЛЮЧЕВОЙ БЕЛОК СИСТЕМЫ MMR

На сегодняшний день накоплено много структурной и биохимической информации о белке MutS и его гомологах. Белок MutS из *E. coli* представляет собой полипептид с молекулярной массой 95 кДа. Четвертичная структура MutS в растворе представлена равновесной смесью димеров и тетрамеров [73], образованных равнозначными по первичной структуре субъединицами. У большинства других видов димеризуются две различные субъединицы. У человека найдено шесть гомологов MutS (MSH1–MSH6). Гетеродимеры, названные MutS α (MSH2–MSH6) и MutS β (MSH2–MSH3), совместно выполняют функции бактериального белка MutS, обеспечивая точность митотической репликации (табл. 1). MSH1 поддерживает генетическую стабильность в митохондриях эукариот [20]. Гетеродимер MSH4–MSH5 вовлечен в узнавание структур Холлидея при мейозе [74–76] и не участвует в репарации ошибок репликации. С помощью биоинформатического анализа построено филогенетическое дерево, отражающее функциональную специализацию гомологов MutS [77] (рис. 2).

Структура белка MutS *E. coli* и функции его отдельных доменов

Важнейшей вехой в исследовании белка MutS стало выяснение его кристаллической структуры. В 2000 году были расшифрованы кристаллические структуры комплексов MutS из *E. coli* [55] и *Thermus aquaticus* [78] с ДНК, содержащей неканоническую пару G/T. Позднее были получены кристаллы белков MutS и их мутантных форм в комплексах с ДНК, содержащими различные «мисматчи» [79–83]. Из эукариотических гомологов MutS определены структуры MSH α и MSH β человека. На сегодняшний день решена структура более 20 комплексов MutS с ДНК [55, 78, 79, 81–86], информация о них доступна в электронной базе данных трехмерных структур белков (PDB) (табл. 2).

Следует отметить однотипность всех структур комплексов MutS с ДНК, полученных методом рентгеноструктурного анализа (РСА). Они представляют собой «начальный» узнающий комплекс (IRC) MutS с ДНК, содержащей «мисматч». Белок MutS образует в этих структурах специфические контакты с неканонической парой нуклеотидов и связан с кофактором ADP. Единственная структура MutS в комплексе с ДНК, содержащей G/T-«мисматч», и двумя молекулами АТФ (код PDB 1W7A) получена пропитыванием кристаллов раствором АТФ. При этом молекулы

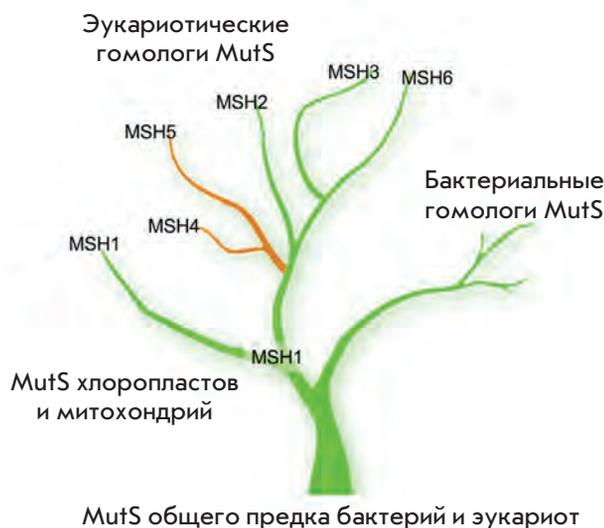


Рис. 2. Филогенетическое дерево белков семейства MutS. Зеленые ветви обозначают группы гомологов MutS, участвующие в поддержании стабильности генетического материала при вегетативном делении клеток, коричневые — при мейотической рекомбинации ДНК

оставались жестко зафиксированными в кристаллической решетке, что препятствовало значительным конформационным перестройкам комплекса [85]. Информацию о структуре белка на этапе сканирования ДНК в поисках «мисматча» или на этапе передачи сигнала другим компонентам системы репарации MMR получить не удастся из-за высокой динамичности комплексов MutS с ДНК на этих этапах.

Первичная структура MutS высококонсервативна у всех живых организмов. Как вторичная, так и третичная структура этого белка у разных организмов имеет значительное сходство. В комплексе с ДНК белок представляет собой димер продолговатой формы с двумя каналами (длиной около 100 Å). Своими очертаниями он напоминает греческую букву θ [87] (рис. 3А,Б). В то время как дуплекс с «мисматчем» располагается в большем из каналов, функция второго канала остается неизвестной, но его размеры и заряд позволяют сделать вывод, что он способен контактировать с ДНК [82].

Методом РСА установлена структура белка с высоким разрешением (до 2 Å). В белке, свободном от ДНК (PDB-код 1EWR), не удалось охарактеризовать структуры четырех областей (остатки 2–13, 57–66, 95–107 и 659–668), что указывает на конформационную подвижность белка в отсутствие ДНК. В комплексах MutS с ДНК, содержащей «мисматч», положение всех аминокислот, за исключением петли, образованной остатками 659–668, хорошо определяется [55].

Таблица 2. Кристаллические структуры белка MutS

Организм	ДНК ¹	АТФ или АДФ	Разреш., Å	Код PDB	Ссылка	Замена а.о.
<i>E. coli</i> ²	G/T	АДФ	2.20	1E3M	[55]	—
	«	«	2.10	1WB9	[84]	E38T
	«	«	2.50	1WBB	[84]	E38A
	«	«	2.40	1WBD	[84]	E38Q
	«	«	2.20	3K0S	[83]	D693N
	«	АДФ (2 молекулы)	2.60	1NG9	[79]	R697A
	«	АТФ (2 молекулы)	2.27	1W7A	[85]	—
	A/A	АДФ	2.40	1OH6	[81]	—
	A/A	«	3.40	2WTU	[83]	—
	G/G	«	2.50	1OH7	[81]	—
	C/A	«	2.90	1OH5	[81]	—
доп. Т	«	2.90	1OH8	[81]	—	
<i>Thermus aquaticus</i> ³	—	—	3.19	1EWR	[78]	—
	доп. Т	—	2.20	1EWQ	[78]	—
	доп. Т	АДФ (2 молекулы)	2.70	1FW6	[79]	—
	доп. Т	АДФ (2 молекулы)-BeF ₃	3.11	1NNE	[82]	—
Человек (MSH α)	G/T	АДФ	3.30	2O8E	[86]	—
	G/T	АДФ (2 молекулы)	2.75	2O8B	«	—
	G/dU	АДФ	3.00	2O8D	«	—
	m ⁶ G/T ⁴	«	3.37	2O8C	«	—
	доп. Т	«	3.25	2O8F	«	—
Человек (MSH β)	петля 4 н.о. ⁵	АДФ	3.09	3THW	—	—
	петля 3 н.о.	«	2.70	3THX	—	—
	петля 2 н.о.	«	2.89	3THY	—	—
	петля 6 н.о.	«	4.30	3THZ	—	—

¹Указана неканоническая пара нуклеотидов в ДНК-дуплексе, использованном для кристаллизации.

²В случае MutS *E. coli* использовались делеционные мутанты, содержащие 1–800 а.о.

³В случае MutS *T. aquaticus* использовались делеционные мутанты, содержащие 1–782 а.о.

⁴m⁶G – Об-метил-2'-дезоксигуанозин.

⁵н.о. – нуклеотидный остаток.

Каждый мономер MutS образует семь структурных доменов (рис. 3Б). N-Концевой домен является «мисматч»-связывающим (а.о. 2–115). Этот домен сформирован смешанным β -слоем, состоящим из пяти тяжей и окружающих его трех α -спиралей. Следующий за ним соединяющий домен (а.о. 116–266) в основном состоит из параллельных β -тяжей, которые окружены четырьмя α -спиральями. Коровый домен (а.о. 267–443 и 540–567) представляет собой два пучка α -спиралей. Рычажный домен (а.о. 504–567) состоит из двух α -спиралей, выступающих из корового домена и окружающих ДНК, но не соприкасающихся с ней. Важная черта структур прокариотического, и эукариотического гомологов MutS – длинная α -спираль из 60 а.о., которая соединяет коровый домен с доменом «зажим». Скорее всего, эта спираль принимает участие в передаче сигнала между АТФ-

азным и ДНК-связывающим доменами [86]. Домен «зажим» (а.о. 444–503) является вставкой в верхнюю часть рычажного домена. Он сформирован четырьмя антипараллельными β -тяжами. АТФ-связывающий домен (АТФ-азный, а.о. 568–765) и домен НТН (от англ. НТН helix-turn-helix, спираль-поворот-спираль, а.о. 766–800) находятся в С-концевой части белка.

В структуре комплекса MutS с ДНК, содержащей «мисматч» (с гетеродуплексом), белок представляет собой асимметрично организованный гомодимер. Субъединица, образующая специфические контакты с «мисматчем», далее называется субъединицей 1 (на рис. 3 ее домены обозначены разными цветами). Вторая субъединица, образующая контакты только с углеводофосфатным остовом ДНК, далее называется субъединицей 2 (на рис. 3 обозначена зеленым цветом). Белок окружает ДНК в месте «мисматча»,

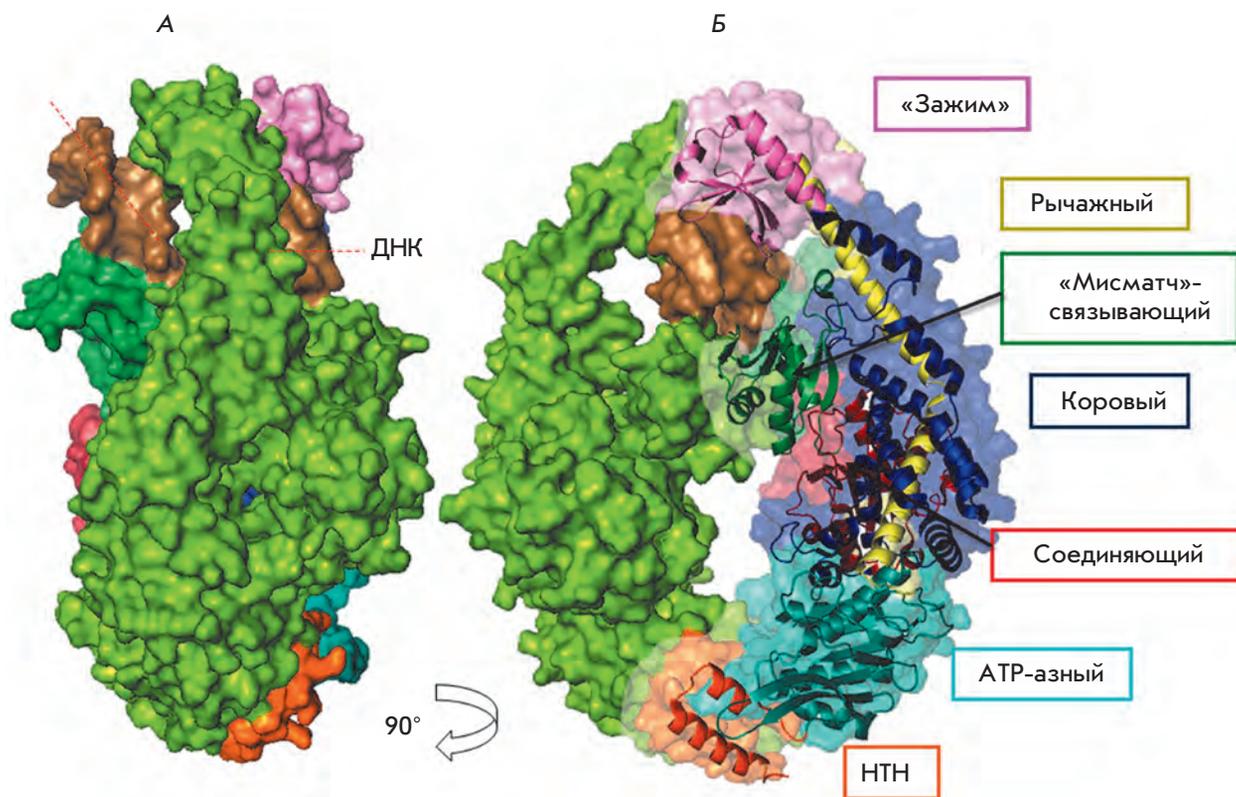


Рис. 3. Общая структура комплекса белка MutS из *E. coli* с ДНК, содержащей G/T-«мисматч». Представлены вид сбоку (А) и фронтальный вид (Б). ДНК окрашена коричневым, субъединица 2 MutS выделена зеленым цветом. На изображении Б указаны домены ДНК-связывающей субъединицы 1: «мисматч»-связывающий домен (а.о. 2–115) окрашен темно-зеленым цветом, соединяющий домен (а.о. 116–266) – красным, коровый домен (а.о. 267–443) – синим, рычажный домен (а.о. 504–567) – желтым, домен «зажим» (а.о. 444–503) – розовым, АТР-азный домен (а.о. 568–765) – голубым, домен НТН (а.о. 766–800) – оранжевым. Красной пунктирной линией указан изгиб ДНК (PDB-код 1E3M)

закрывая при этом область из 24–28 п.н. [88]. MutS охватывает ДНК в виде «зажима». Для связывания белком ДНК «зажим» должен «раскрыться». Полагают, что раскрытию «зажима» способствует гибкая, содержащая большой процент петель, структура верхней части этого домена [89]. Гибкость ДНК-связывающих доменов подтверждается тем, что в кристаллах MutS, не связанного с ДНК, они не структурированы [78].

В специфическом комплексе с MutS ДНК изогнута на 60° [78, 79] (рис. 3). В вершине угла находятся основания неканонической пары нуклеотидов. Изгиб приводит к расширению малой бороздки ДНК, так что ее ширина примерно совпадает с шириной большой бороздки. В специфическом комплексе аминокислотные остатки из обеих субъединиц MutS взаимодействуют с ДНК, однако связывание асимметрично – каждая субъединица образует множество контактов, но они различны. Общая площадь

поверхности ДНК-белковых контактов составляет ~1850 Å² [81]. Большинство контактов белка с ДНК являются гидрофильными (аминокислотные остатки взаимодействуют с углеводофосфатным остовом ДНК) и не зависят от нуклеотидной последовательности. Благодаря этому MutS способен функционировать в различных нуклеотидных контекстах. Только аминокислоты из субъединицы 1 (мотив Phe-X-Glu) образуют специфические контакты с «мисматчем» [86]. Среди эукариотических гомологов этот мотив присутствует в MSH6, но отсутствует в MSH2 и MSH3. Еще до получения результатов PCA было установлено, что в связывании MutS с ДНК важную роль играет Phe36 (нумерация для MutS из *E. coli*). Замена Phe36 на Ala нарушает способность MutS к специфическому взаимодействию с ДНК [90]. Возможно, Phe36 важен при поиске «мисматча». Согласно данным PCA, фенилаланин из мотива Phe-X-Glu вовлечен в межплоскостные взаимодействия

(«стэкинг») с одним из гетероциклических оснований «мисматча» со стороны малой бороздки ДНК [55, 78]. В специфическом связывании MutS с «мисматчем» в ДНК важную роль играет также Glu38 (нумерация для MutS из *E. coli*), который контактирует с тем же гетероциклическим основанием, что и Phe36. В результате такого взаимодействия формируется водородная связь между карбонильным кислородом Glu38 и атомом азота основания. В структурах MutS с дуплексом, содержащим неканоническую пару G/T или неспаренный нуклеотид T, Glu38 образует водородную связь с N3-атомом T. При взаимодействии MutS с дуплексами, содержащими пары C/A и A/A, Glu38 образует водородную связь с N7-атомом пурина; аналогичный контакт формируется и с неканонической парой G/G [81]. Специфические контакты определяют направление изгиба ДНК. Показано, что замена консервативного остатка Glu38 на глутамин полностью нарушает способность белка различать канонический и «мисматч»-содержащий дуплексы [91].

К сожалению, на сегодняшний день мало известно о структуре неспецифического комплекса MutS с канонической ДНК (гомодуплексом), так как не удалось получить кристаллы MutS с таким фрагментом ДНК. Сиксма и соавт. [89] предполагают, что белок ищет «мисматч» по механизму связывания-высвобождения, пытаясь встроить Phe36 в «стопку» оснований на каждом этапе, и в результате изогнуть ДНК. «Мисматч» обычно не искажает структуру ДНК-дуплекса [92, 93], но дестабилизирует его [94]. Натраджан и соавт. [81] полагают, что MutS способен обнаруживать эти локальные ослабления структуры ДНК. С использованием атомной силовой микроскопии показано, что ДНК канонического состава в комплексе с MutS может находиться в одной из двух конформаций: изогнутой или выпрямленной [95]. Считается, что в поисках «мисматча» MutS постоянно изгибает и выпрямляет ДНК. Обнаружение «мисматча» приводит к АТФ-зависимым перестройкам доменов MutS и образованию активированного ДНК-белкового комплекса.

Белок MutS относится к АВС-семейству АТФ-аз (от англ. ATP binding cassette). Белки этого класса, такие, как мембранные трансферазы, связывают субстрат и для регуляции своей активности гидролизуют АТФ. У некоторых членов этого семейства наблюдается димеризация АТФ-азных доменов [96, 97]. У белка MutS площадь димеризации в районе АТФ-азных доменов значительна и составляет 2922 Å² [85]. Характерной чертой белков АВС-семейства АТФ-аз является консервативная петля, выступающая из одной субъединицы и дополняющая активный центр АТФ-азного домена в другой субъединице. Связывание

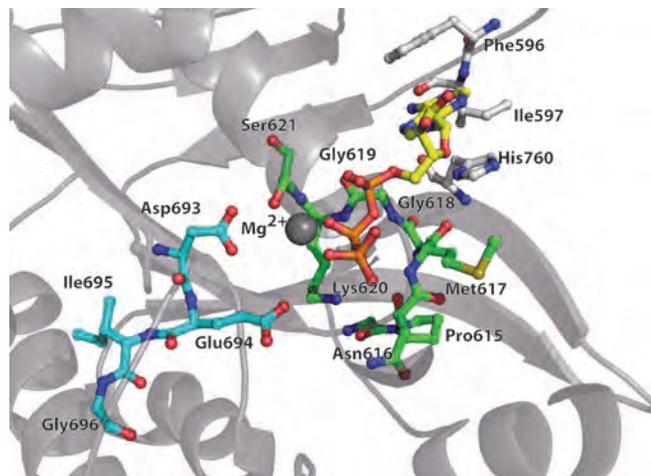


Рис. 4. АТФ-азный домен белка MutS. Аминокислотные остатки, образующие контакты с АДФ, выделены светло-серым цветом, аминокислоты мотива Уолкера из субъединицы 1 обозначены зеленым, из субъединицы 2 – голубым, молекула АДФ отмечена желто-оранжевым цветом, Mg²⁺ – серым

АТФ или АДФ происходит классическим для АТФ-аз способом через Р-петлю (от англ. phosphate-binding). Положение аденинового основания фиксируется с двух сторон остатками His760 и Phe596 (в MutS из *E. coli*, рис. 4). Консервативный Ile597 образует с нуклеотидом две водородные связи. Ser621 координирует образование комплекса иона Mg²⁺ и β-фосфата АДФ с участием четырех молекул воды [55]. Мотив Уолкера (англ. Walker motif, D-E-X-X, где X – любая аминокислота) в MutS из *E. coli*, образованный а.о. 693–696, стабилизирует молекулы воды, связанные с Mg²⁺ [55]. Замены этих аминокислотных остатков приводят к потере АТФ-азной активности белком MutS и инактивации системы репарации [85].

Данные, полученные биохимическими методами, свидетельствуют о значительных конформационных перестройках АТФ-азных доменов при связывании АТФ или его негидролизующих аналогов [98–100]. Однако в кристалле комплекса MutS с ДНК, в котором MutS связан с двумя молекулами АТФ, лишь некоторые аминокислотные остатки (Ser668, Asn616 и His728) меняют свое положение по сравнению с комплексом в присутствии АДФ [85]. Согласно биохимическим данным сродство двух АТФ-азных доменов друг к другу выше при связывании АТФ и ниже в присутствии АДФ. Общая структура белка MutS наиболее компактна при связывании двух молекул АТФ, тогда как наиболее релаксированная форма наблюдается в присутствии АДФ. Свободный от АТФ и АДФ белок имеет промежуточную конформацию

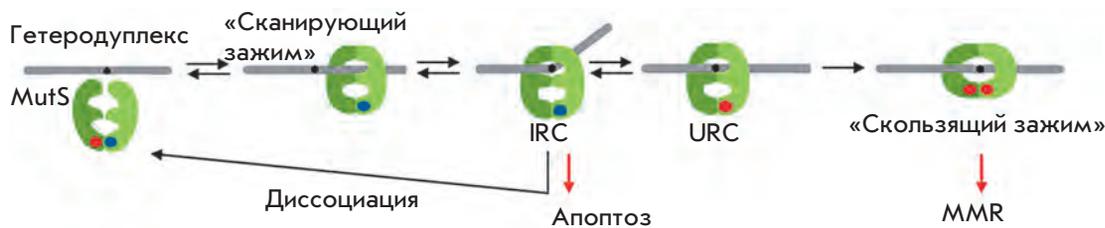


Рис. 5. Динамическая модель узнавания «мисматча» белком MutS. Гетеродуплекс – ДНК-дуплекс с неканонической парой

[101]. Косвенные наблюдения также свидетельствуют о модулировании конформации белка нуклеотидами. Например, распределение продуктов частичного протеолиза MutS из *E. coli* в присутствии ADP, ATP и ATP γ S отличалось от распределения в отсутствие нуклеотидов [98, 99].

Кроме того, в MutS обнаружена характерная для ABC-семейства ATP-аз неравнозначность двух доменов белка при связывании ADP [55, 85]. ADP более эффективно связывается в субъединице 1, образующей специфические контакты с «мисматчем». Асимметричность доменов наблюдается даже в отсутствие ДНК [83, 102].

Структурные и биохимические данные свидетельствуют о том, что конформационные изменения в ATP-азном домене стимулируют перестройки в ДНК-связывающих доменах и наоборот. Передача сигнала на расстояние ~60 Å и его усиление происходит через α -спирали, соединяющие два функциональных домена белка и высококонсервативную подвижную петлю ATP-азных доменов (рис. 4). Считается, что Glu38, Glu694, Asp693, Asn616, His728 и Ser668 являются основными аминокислотами, участвующими в передаче сигнала между ДНК-связывающими и ATP-азными доменами [84]. Замена этих аминокислотных остатков приводят к утрате связи между ДНК-связывающей и ATP-азной активностями MutS, в результате чего белок теряет свою функцию в MMR.

Полноразмерный белок MutS образует в растворе тетрамеры и олигомеры более высокого порядка. Тетрамеризация MutS важна для подавления гомологичной рекомбинации и репарации аддуктов цисплатина с ДНК [103]. Следует отметить, что тетрамер MutS является не просто димером димеров, так как способен связывать только один гетеродуплекс [73]. Все кристаллические структуры, где MutS является димером, получены с использованием укороченной формы белка, лишенной С-концевых аминокислот (53 а.о. в MutS из *E. coli*).

Этапы действия MutS в процессе MMR

В функционировании MutS можно выделить несколько этапов (рис. 5). Белок неспецифически свя-

зывается с ДНК и изгибает ее в поисках «мисматча». Перемещение MutS по ДНК на этом этапе происходит в ходе линейной диффузии [104]. При специфическом связывании с неканонической парой нуклеотидов в белке и в ДНК происходят конформационные перестройки с формированием «начального» узнающего комплекса, IRC [13]. В этом комплексе ДНК изогнута на 60° [55]. На сегодняшний день кристаллическая структура комплексов с ДНК только этого типа выяснена методом РСА. Предполагается, что следом за IRC происходит формирование «окончательного» узнающего комплекса, URC (англ. ultimate recognition complex), в котором ДНК выпрямлена, и неканоническая пара нуклеотидов расположена вне двойной спирали. Это предположение основано на аналогии с другими белками, такими, как ДНК-метилтрансферазы, транспозаза Tn10 и др., которые, так же как и MutS, «вклинивают» узнающие аминокислоты в ДНК со стороны малой бороздки [105, 106]. Затем связанный с ATP белок переходит в активную конформацию «скользящего зажима», способного активировать последующие этапы репарации неканонических пар нуклеотидов.

Роль ATP-азного цикла MutS

Связывание ADP или ATP в двух субъединицах MutS необходимо для перехода из одного конформационного состояния в другое и позволяет белку действовать как молекулярный переключатель [104, 107, 108].

Два нуклеотидсвязывающих центра MutS выполняют разные функции в MMR [79], что находится в соответствии со структурной асимметрией, обнаруженной методом РСА [55, 78]. Обе субъединицы могут одновременно связывать адениновые нуклеотиды, при этом тип нуклеотида (ATP или ADP) не важен [109]. Константы диссоциации комплексов MutS с ATP или ADP находятся в диапазоне 1–20 мкМ. Такое сродство позволяет сделать вывод, что состояние MutS, при котором один или оба нуклеотидсвязывающих участка свободны от нуклеотидов, существует только временно. Показано, что MutS проявляет различное сродство к ATP, ADP и к негидролизуемым аналогам ATP. Тем не менее единства взглядов на эффективность взаи-

модействия этих нуклеотидов с MutS нет. Например, даже при высокой концентрации ADP (100 мкМ) с гомологами MutS из *E. coli*, дрожжей и человека связывался только один эквивалент нуклеотида на димер белка [73, 109, 110]. С другой стороны, отношение связанных нуклеотидов ADP к ATP в MutS α в отсутствие ДНК составляет 1.6. Таким образом, белок связывает нуклеотиды в различных комбинациях – ATP/ADP или ADP/ADP, где вторая комбинация возникает в результате гидролиза молекулы ATP из первой комбинации [13]. На сегодняшний день надежно установлено, что MSH6 (и соответствующая ему субъединица 1 бактериального MutS) связывает ATP с более высокой эффективностью, чем MSH2 (субъединица 2 бактериального MutS) [111, 112]. ATP-азную активность всех гомологов MutS стимулирует присутствие ДНК (как канонической, так и неканонической) [113]. Однако данные о влиянии неканонической пары нуклеотидов в составе ДНК на ATP-азную активность MutS противоречивы. В некоторых работах описывается ускорение (до 4 раз) гидролиза ATP в присутствии ДНК с «мисматчем» по сравнению с гомодуплексом [107]. В другом исследовании [114] ДНК, содержащая «мисматч», стимулировала ATP-азную активность MutS в меньшей степени, чем ДНК канонического строения. Как гомо-, так и гетеродуплексы ускоряют обмен нуклеотидов в ATP-азных доменах [113], однако только в случае гетеродуплекса этапом, лимитирующим скорость, становится не обмен нуклеотидов (происходящий после гидролиза), а сам цикл гидролиза ATP [107].

Координацию процессов связывания ДНК и гидролиза ATP в ATP-азных доменах обеих субъединиц MutS можно описать двумя схемами. Согласно схеме 1 [83] при сканировании ДНК белком MutS в поисках «мисматча» ATP-азный домен субъединицы 1 содержит одну молекулу ADP. Если ДНК является субстратом системы репарации неканонических пар нуклеотидов, например, содержит G/T-пару, MutS образует специфический комплекс. При этом в ATP-азных доменах ADP заменяется на ATP. ATP-азный домен второй субъединицы также связывает ATP, затем в молекуле MutS происходят конформационные изменения, приводящие к образованию структуры «скользящий зажим». «Скользящий зажим» служит сигналом для привлечения белка MutL, который активирует дальнейшие этапы репарации. После этого происходит диссоциация MutS из комплекса с ДНК и гидролиз ATP. Белок MutS после завершения цикла сохраняет связанную молекулу ADP в одном из ATP-азных доменов и готов к новому акту взаимодействия с ДНК.

Схема 2 [115] предполагает иной подход к пониманию нуклеотидсвязывающей и ATP-азной функций

MutS. Эта схема основана на данных РСА, дополненных расчетами с использованием метода «нормальных режимов» (normal mode). Согласно построенной модели субъединица 1 в процессе сканирования ДНК связывает и сразу же гидролизует ATP. Высвобождение ADP является стадией, лимитирующей скорость ATP-азного цикла. В субъединице 2 в это время находится только ADP. После образования специфического комплекса с «мисматчем» обе субъединицы теряют сродство к ADP, связывают и удерживают ATP. Только после перехода MutS из структуры «скользящий зажим» снова в режим сканирования ДНК происходит гидролиз ATP в обеих субъединицах.

На наш взгляд, схемы 1 и 2 имеют существенные различия:

1. По схеме 1 в субъединице 2 в процессе сканирования ДНК отсутствуют ATP и ADP, тогда как в схеме 2 субъединица 2 обладает на этом этапе повышенным сродством к ADP.

2. Согласно схеме 1 MutS в ходе сканирования ДНК в поисках «мисматча» не гидролизует ATP, гидролиз происходит только на этапе высвобождения MutS из комплекса с ДНК, тогда как по схеме 2 гидролиз ATP происходит и на этапе сканирования ДНК, и после образования специфического комплекса.

Следует заключить, что не существует ясного представления о функционировании ATP-азных доменов MutS и о координации их функции с различными стадиями функционирования белка MutS, и дискуссия об этом продолжается.

БЕЛОК MutL – МОЛЕКУЛЯРНЫЙ КООРДИНАТОР MMR

Одна из уникальных особенностей процесса репарации «мисматчей» – удаленность «мисматча» от участка гидролиза дочерней цепи ДНК вплоть до 2000 п.н. Поэтому имеет место четкая координация во времени и пространстве всех белков, вовлеченных в MMR. Центральную роль в координации различных этапов MMR приписывают белку MutL. MutL получает сигнал об обнаружении «мисматча» и направляет эксцизионную репарацию в дочерней цепи ДНК и репаративный синтез ДНК. Выполняя функцию координатора процессов репарации «мисматчей», MutL взаимодействует с MutS и с большинством белков, принимающих участие в последующих этапах репарации: MutH, UvrD-хеликазой, полимеразой III и факторами процессивности полимеразы – β -зажимом (у прокариот) и ядерным антигеном пролиферирующих клеток (PCNA, у эукариот), экзонуклеазой ExoI (у прокариот) и полимеразой Pol η (у эукариот) [116]. Роль MutL и его эукариотических гомологов не ограничивается репарацией «мисматчей» ДНК. Показано, что MutL взаимодействует с белка-

Таблица 3. Кристаллические структуры белка MutL

Организм	Фрагмент белка	Кофакторы и их аналоги	Разрешение, Å	Код PDB	Ссылка
<i>E. coli</i>	N-Концевой участок – фрагмент АТФ-азного домена (LN40)	-	2.90	1BKN	[122]
	«	ADP, Mg ²⁺	2.10	1B62	[121]
	«	ADPnP ¹ , Mg ²⁺	1.90	1B63	[121]
	«	ADPnP, Mg ²⁺ , Rb ⁺	2.40	1NHH	[123]
	«	ADPnP, Mg ²⁺ , K ⁺	2.00	1NHI	[123]
	«	ADPnP, Mg ²⁺ , Na ⁺	2.30	1NHJ	[123]
<i>Bacillus subtilis</i>	С-Концевой домен	Na ⁺	2.10	1X9Z	[124]
	С-Концевой домен	-	2.50	3GAB	[125]
	«	-	2.00	3KDG	[125]
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	«	Zn ²⁺	2.26	3KDK	[125]
	С-Концевой домен	-	2.40	3NCV	[126]
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (MLH1/PMS1)	С-Концевые домены гетеродимера	-	2.50	4E4W	—
	С-Концевые домены гетеродимера с фрагментом N-концевого домена	Zn ²⁺	2.69	4FMN	—
	С-Концевые домены гетеродимера с фрагментом экзонуклеазы I	Zn ²⁺ , Mg ²⁺	3.04	4FMO	—
Человек (MLH1)	N-Концевой домен	АТФ	2.50	3NA3	—
	С-Концевой домен	-	2.16	3RBN	—

¹ADPnP – 5'-аденилил-β,γ-имидодифосфат.

ми, которые участвуют в различных процессах, затрагивающих ДНК, таких, как репарация двухцепочечных разрывов ДНК, обеспечение клеточного ответа на повреждение ДНК, запуск апоптоза, мейотическая рекомбинация и соматическое гипермутирование [116–119]. Все это делает MutL главным звеном в координации узнавания повреждения в ДНК и в клеточном ответе на повреждение одним из возможных способов: репарацией, задержкой клеточного деления или апоптозом [116].

MutL (и его эукариотические гомологи) неспецифически связывает одно- и двухцепочечную ДНК [111, 120]. Предполагается, что взаимодействие MutL с ДНК происходит в комплексе с MutS. Биохимические исследования белка MutL затруднены из-за его конформационной мобильности, и о его действии можно судить только через изменение функции его белков-партнеров [116].

Белок MutL, как и MutS, функционирует в виде димера: гомодимера у *E. coli* и гетеродимера у эукариот (MutLα = MLH1 и PMS2, MutLβ = MLH1 и PMS1, MutLγ = MLH1 и MLH3). Полипептидная цепь MutL из *E. coli* имеет массу 68 кДа [121]. Структура полноразмерного белка не установлена, однако получены кристаллы С-концевого и N-концевого доменов по отдельности [122–127]. Все имеющиеся к настоящему моменту структуры, решенные для MutL и его гомологов, представлены в табл. 3.

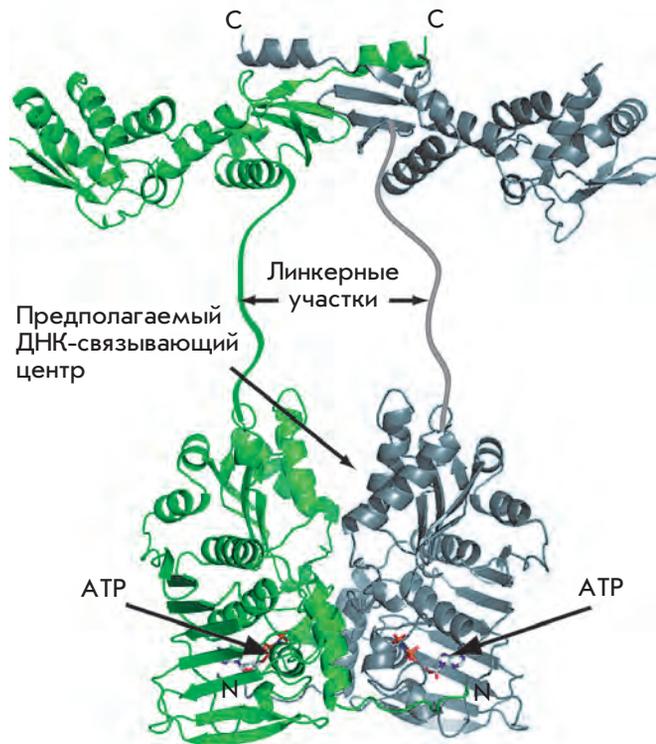


Рис. 6. Модель структуры полноразмерного гомодимерного белка MutL из *E. coli*, полученная на основе структуры N-концевого (PDB-код 1B62) и С-концевого (PDB-код 1X9Z) доменов

Существующая на сегодняшний день модель структуры MutL (рис. 6) получена на основе данных РСА для N- и C-концевых доменов белка [128]. Согласно этой модели N-концевой (а.о. 1–349) и C-концевой (а.о. 432–615) домены соединены между собой неструктурированным участком (а.о. 350–431) [125, 129]. Интересно, что первичная структура C-концевого домена гомологов MutL не является высококонсервативной, а вторичная структура консервативна, тогда как и первичная, и вторичная структуры N-концевого домена высококонсервативны.

В димере MutL C-концевые домены участвуют в образовании димеризационного интерфейса, а N-концевые домены содержат АТР-связывающие участки. MutL является АТР-азой, принадлежащей к новому семейству АТР-аз, не содержащих мотив Уолкера. К этому же семейству относятся топоизомеразы второго типа (гиразы), белок-шаперон Hsp90 и гистидиновые киназы [130]. Связывание и гидролиз АТР приводят к структурным перестройкам всего N-концевого домена [122]. В присутствии АТР и АТР N-концевые домены димеризуются. Для эукариотических гомологов MutL показана различная активность двух АТР-азных доменов гетеродимеров в АТР-азном цикле [131]. Значение АТР-азного цикла велико для функционирования MutL. Мутантные формы MutL, у которых АТР-азная активность отсутствует, не способны участвовать в репарации и выполнении остальных функций белка [132]. Полагают, что АТР-азная активность необходима белку MutL для модулирования белок-белковых взаимодействий [122].

Две петли MutL, приближенные к N-концу, участвуют во взаимодействии с MutS, а желобок, сформированный вдоль боковой поверхности N-концевого домена, вовлечен в связывание с MutH [133] (рис. 6). Желобок седловидной формы, находящийся на поверхности N-концевого домена, скорее всего, участвует в связывании с ДНК. Мутации основных аминокислот, находящихся в этом участке, например Arg266, приводят к уменьшению сродства MutL к ДНК и снижают его АТР-азную активность [134, 135]. Однако предположение о ДНК-связывающей поверхности в MutL требует экспериментальных подтверждений. Интересно, что MutL α содержит эндонуклеазный мотив DQNA(X)₂E(X)₄E (X – любая аминокислота), локализованный в субъединице PMS2 [136]. Этот каталитический мотив найден у всех гомологов MutL, за исключением гамма-протеобактерий, у которых сайт-направленный гидролиз дочерней цепи ДНК осуществляет белок MutH. Тем не менее регуляция функции каталитического мотива MutL при гидролизе дочерней цепи ДНК до конца не выяснена.

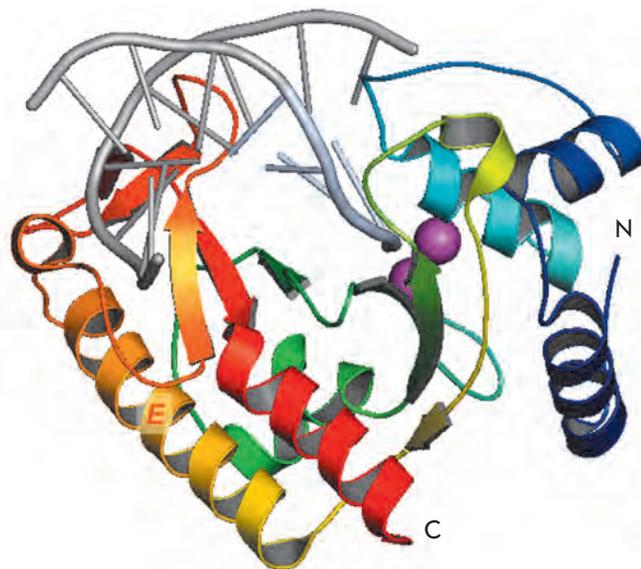


Рис. 7. Кристаллическая структура комплекса белка MutH из *Haemophilus influenzae* с ДНК (выделена серым), содержащей монометилированный участок 5'-Gm⁶ATC-3'/3'-CTAG-5' (PDB-код 2AOR). Координированные в комплексе два иона Ca²⁺ обозначены фиолетовым цветом. Указана α -спираль E MutH, взаимодействующая с белком MutL

MutH – БЕЛОК, НАПРАВЛЯЮЩИЙ MMR В *E. coli*

Белок MutH – мономерная сайт-специфическая нуклеаза массой 25 кДа обладает сходством с эндонуклеазой рестрикции II-го типа Sau3AI [137] и по структуре напоминает PvuII и EcoRV [138]. Белок MutH специфически связывает двухцепочечную последовательность 5'-Gm⁶ATC-3'/3'-CTAG \downarrow -5' (стрелкой указано место гидролиза) и катализирует гидролиз только одной – неметилированной, т.е. вновь синтезированной цепи ДНК [16]. Кроме того, MutH гидролизует и неметилированные участки, что может привести к появлению двухцепочечных разрывов [101]. Полностью метилированную последовательность ДНК MutH практически не узнает и не гидролизует [139]. Подобно большинству эндонуклеаз рестрикции II-го типа MutH содержит характерный мотив Asp(X)_n-Glu-X-Lys (DEK-мотив, X – любая аминокислота). Для проявления каталитической активности фермента требуются два иона Mg²⁺ [140]. Скорость гидролиза ДНК этим ферментом невелика, однако она значительно увеличивается в присутствии MutS, MutL и при наличии в ДНК «мисматча» [79]. При низкой ионной силе раствора активность MutH стимулируется белком MutL без участия MutS, связанного с «мисматчем» [91].

Определена кристаллическая структура MutH из *Haemophilus influenzae* (61% идентичности с MutH

из *E. coli*) как в комплексе с ДНК, так и без ДНК [137, 140]. По укладке фермент напоминает эндонуклеазу рестрикции II-го типа – PvuII [138]. Апофермент MutH представляет собой охватывающий «зажим» из двух «рук» (N- и C-«руки», рис. 7), разделенных большим ДНК-связывающим карманом. Каталитический центр находится в N-«руке». В C-«руке» находятся аминокислоты, отвечающие за специфическое связывание участка узнавания белка, в частности, образующие контакты с гетероциклическими основаниями. При связывании специфической ДНК белок компактизуется, «руки» смещаются одна относительно другой на 6–18° по сравнению с закрытой апоформой белка, ДНК-связывающий карман сужается, плотно охватывая участок узнавания в ДНК. Структура ДНК также претерпевает перестройки, при этом неметилированный участок узнавания сильнее изогнут и искажен (угол изгиба составляет около 30°), чем монометилированный. Тем не менее локальные ДНК-белковые контакты с участками узнавания в двух комплексах не отличаются. Однако монометилированная ДНК плотнее охвачена ферментом, чем неметилированная (площадь ДНК-белкового контакта составляет 2100 и 1850 Å² соответственно). В результате ДЕК-мотив эффективнее взаимодействует с ДНК, что обуславливает на порядок большую скорость гидролиза монометилированного участка узнавания по сравнению с неметилированным [140]. Таким образом, в случае белка MutH степень изгиба ДНК не коррелирует с эффективностью ее гидролиза. Единичные замены аминокислот ДНК-связывающего кармана показали, что в определении метилированного статуса ДНК важен Tyr212 [139].

Важной чертой MutH является увеличение его каталитической активности в процессе MMR. До сегодняшнего дня неясно, каким образом происходит стимуляция активности MutH. В кристаллической структуре апоформы белка MutH ДНК-связывающий канал недостаточно широк для связывания ДНК. Предполагается, что при связывании MutL с MutH расширяется ДНК-связывающий канал последнего, что увеличивает скорость связывания MutH с ДНК [140]. Как показано с помощью белок-белковых сшивок, MutL взаимодействует с расположенной на поверхности глобулы MutH C-концевой α-спиралью E [141] (рис. 7). Возможно, образование белок-белковых контактов облегчает вращательное движение C-«руки» MutH, ДНК-связывающий карман оказывается в результате более доступным для связывания с субстратом [132, 140].

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ MutS, MutL, MutH И ДНК

Как упоминалось ранее, тройной комплекс, состоящий из белков MutS и MutL, связанных с ДНК, яв-

ляется ключевым интермедиатом в репарации «мисматчей» ДНК. Он координирует все этапы репарации после распознавания «мисматча» (т.е. эксцизионную репарацию, включая расплетание ДНК по направлению к «мисматчу») и участвует также в передаче сигнала о повреждении ДНК другим системам клетки, контролирующим клеточное деление и запуск апоптоза [142]. Однако структура этого комплекса на сегодняшний день не выяснена. Кроме того, сам белок MutL имеет довольно низкое сродство к ДНК, особенно к ее коротким линейным фрагментам. В присутствии MutS, ионов Mg²⁺ и АТФ связывание с ДНК происходит более эффективно [83, 115].

Тройной комплекс (MutS, MutL и ДНК) имеет динамичную природу, поэтому его невозможно изучать методами кристаллизации и РСА. Для изучения областей контакта белков MutS и MutL использовали мутационный анализ и масс-спектрометрию, основанную на водород/дейтериевом обмене. Было установлено, что аминокислотные остатки MutS, важные для образования контактов с MutL, расположены в его соединительном домене [143]. Во взаимодействии с MutS принимает участие N-концевой, АТФ-азный домен MutL [133]. Кроме того, проведены детальные исследования, основанные на сайт-направленной белок-белковой «сшивке» с помощью бифункциональных химических агентов, реагирующих с остатками цистеина белка, в сочетании с флуоресцентными методами [144]. Предварительно были сконструированы мутантные формы белков MutS и MutL, содержащие единственный остаток цистеина в заданном положении. На основе экспериментальных данных П. Фридрихсхоффом и соавт. [144] предложена модель структуры комплекса MutS, MutL и MutH, связанных с ДНК, содержащей «мисматч» (рис. 8). Для построения модели комплекса авторы использовали структуру белка MutL без C-концевого домена. Ранее было показано [122], что этот домен не контактирует с ДНК, и N-концевого домена MutL достаточно для активации MutH. Согласно модели, аминокислотные остатки в положении 246 MutS и 297 MutL (из обоих мономеров белков) находятся на расстоянии менее 40 Å, а остатки 449 MutS и 297 MutL удалены более чем на 50 Å. Эта модель не описывает все возможные взаимодействия молекул, для создания более полной картины требуются дополнительные исследования. Кроме того, модель не учитывает описанного ранее [95] перехода ДНК из изогнутой формы в линейную после активации MutS, предшествующей взаимодействию MutS с MutL.

Предложенная П. Фридрихсхоффом и соавт. [144] модель комплекса белков MutS, MutL и MutH с ДНК базируется на опубликованной ими ранее модели взаимодействия белков MutL и MutH [133]. Рас-

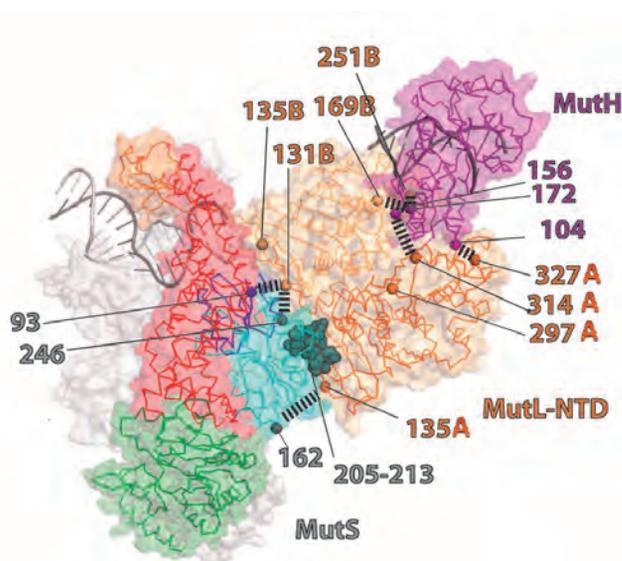


Рис. 8. Структурная модель комплекса MutS–MutL–MutH–ДНК. MutS обозначен серым цветом («мисматч»-связывающий домен выделен красным, соединительный домен – зеленым). N-Концевые домены (NTD) двух субъединиц димера MutL обозначены темно- и светло-оранжевым. С-Концевые и линкерные домены MutL не показаны. Белок MutH выделен фиолетовым цветом. Модель построена на основе структур: MutS (PDB-код 1E3M), MutL (PDB-код 1B63) и MutH с ДНК (PDB-коды 2AZO и 2AOR). Указаны аминокислоты, участвующие в образовании белок-белковых контактов (цвет цифры обозначает принадлежность аминокислотного остатка к тому или иному белку)

стояния между двумя белками и поверхности взаимодействия также определены с использованием мутантных форм MutL и MutH, содержащих единственный остаток цистеина, а также тиолдисульфидных реагентов и «фотокросслинкеров». Сделан вывод о возможности существования комплекса, в котором все три молекулы: MutS, MutL и MutH, находятся в непосредственной близости друг к другу. При этом не требуется формирование разделяющей белки петли ДНК, что позволяет комплексу скользить по ДНК в поисках сигнала дискриминации материнской и дочерней цепей ДНК.

МОДЕЛИ КООРДИНАЦИИ МЕЖДУ УЧАСТКОМ УЗНАВАНИЯ И УЧАСТКОМ ГИДРОЛИЗА ДНК В СИСТЕМЕ ММР

На сегодняшний день существуют различные представления о процессах, которые происходят после формирования «окончательного» узнающего комплекса. В ряде работ сделаны попытки систематизации этих моделей [13, 14, 59, 145]. Однако это только

усложняет ситуацию, так как одни и те же явления описываются с использованием различной терминологии и, наоборот, одни и те же термины применяют к различным процессам. В данном обзоре мы попытались обобщить существующие модели передачи сигнала от «мисматча» к белкам, выполняющим эксцизионную репарацию, основываясь на принципах «физического» взаимодействия белков репарации с ДНК. Взаимосвязь ДНК-связывающей и нуклеотидсвязывающей функций белков рассмотрена выше и не учитывается с целью создания упрощенной картины.

В клетках *E. coli* на этапе передачи сигнала для выявления дочерней цепи и последующей эксцизионной репарации «мисматч» и одноцепочечный разрыв разделяют большие расстояния (вплоть до 2000 п.н.) [146]. Процесс является двунаправленным, т.е. гидролиз происходит как в одном, так и в другом направлении от «мисматча» [61, 147]. Эти экспериментальные факты лежат в основе всех моделей. Различные точки зрения на механизм инициации процесса ММР суммированы на рис. 9.

Существующие транс- и цис-модели [13] координации между участком узнавания и участком гидролиза ДНК в системе ММР различаются тем, требуются ли значительные конформационные перестройки ДНК (например, образование петель в форме буквы α) или нет соответственно. Примеры цис-механизма действия можно найти среди эндонуклеаз рестрикции (типы I и III), а транс-механизм распространен при регуляции транскрипции генов [145].

За основу для создания модели берут и другой признак – остается MutS (или тройной комплекс MutS–MutL–ДНК) связанным с «мисматчем» или перемещается от него. При этом выделяют стационарные модели и модели «скользящего зажима». На сегодняшний день все перечисленные выше модели имеют экспериментальные подтверждения. Наиболее популярна модель «скользящего зажима» [98, 148–150]. Согласно этой модели в «окончательном» узнающем комплексе с ДНК и двумя молекулами АТФ MutS теряет сродство к «мисматчу» и формирует структуру своеобразного ДНК-«зажима». При этом димер белка имеет два канала, разделенных между собой центральными («мисматч»-связывающими) доменами, больший из них связывает ДНК (рис. 3). При образовании «скользящего зажима» в MutS происходят значительные перестройки. Предполагается, что центральные («мисматч»-связывающие) домены из каждой субъединицы димера отходят друг от друга, и таким образом канал, в котором находится ДНК, увеличивается в 2 раза в результате объединения двух каналов [44]. Однако эти предположения нуждаются в экспериментальных подтверждениях.

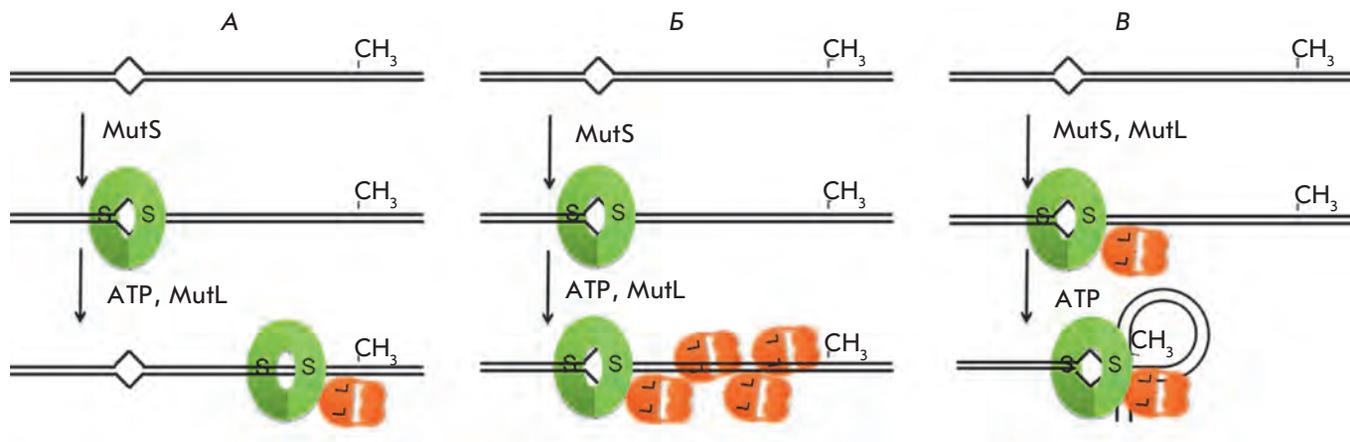


Рис. 9. Модели координации между «мисматчем» и монометилованным участком 5'-Gm⁶ATC-3' / 3'-CTAG-5': цис- (А и Б) и транс- (В). По другой классификации: модели «скользящего зажима» (А), множественной полимеризации MutL на ДНК (Б) и выпетливания ДНК (В)

В конформации «скользящего зажима» MutS служит «включенным» переключателем, способным перемещаться по ДНК и активировать функцию других белков системы MMR. Для такого перемещения MutS не требуется гидролиз АТФ [104]. «Молекулярные зажимы» выполняют важные функции в метаболизме ДНК, например, PCNA направляет репликацию ДНК и увеличивает процессивность ДНК-полимеразы. В пользу этой модели служит тот факт, что и бактериальные белки MutS, и их эукариотические гомологи в присутствии АТФ «соскальзывают» с участка ДНК, содержащего неканоническую пару нуклеотидов, а затем с концов линейных ДНК (если они не «заблокированы» объемными группами или прочно связанными с ними белками) [98, 151]. Недавние исследования [104], выполненные с использованием флуоресцентных методов, позволили рассчитать время жизни «скользящего зажима»: оно оказалось довольно продолжительным и составляло около 10 мин. Обсуждаемый механизм предполагает возможность связывания нескольких молекул MutS с ДНК, содержащей неканоническую пару нуклеотидов, что может повысить эффективность репарации [145].

Согласно другим моделям MutS должен оставаться связанным с ДНК. Например, Кункель и Эре [13] предполагают, что АТФ-зависимое перемещение MutS с «мисматча» не обязательно для его функционирования, и для дальнейших событий репарации важны лишь конформационные изменения белка. В пользу этой модели свидетельствует тот факт, что у тройного комплекса MutS–MutL–ДНК, связанного с АТФ, время жизни в районе «мисматча» больше, чем только у MutS, активированного «мисматчем» и связанного с АТФ [145, 151, 152]. Скорее всего, *in vivo* MutS может перемещаться с «мисматча», но лишь на небольшие

расстояния, так как по результатам футпринтинга [152] и исследований, выполненных методом поверхностного плазмонного резонанса [150], участок ДНК в районе «мисматча» закрыт связавшимися с ним белками. Кункель и Эре также предполагают, что изгиб ДНК в районе «мисматча» или какая-либо деформация ДНК, вызванная белком MutS, должны сохраняться в ходе всех этапов MMR, что будет служить направляющим и, вероятно, терминирующим сигналом при эндонуклеазной деградации дочерней цепи ДНК [13]. Это возможно только при сохранении контакта между «мисматчем» и MutS.

Согласно еще одной стационарной модели передача сигнала от MutS к MutH (между «мисматчем» и участком гидролиза) происходит в результате связывания большого числа молекул MutL с ДНК (образование нуклеопротеиновых филаментов), пока не будет достигнут участок гидролиза ДНК (рис. 9B) [153]. Экспериментальное подтверждение этой модели появилось совсем недавно. Методом флуоресцентной микроскопии на живых клетках, вырабатывающих флуоресцентно меченные белки MutL и MutS, показано, что в районе «мисматча» белков MutL в 3 раза больше, чем MutS [154]. Тем не менее это число недостаточно велико, чтобы можно было однозначно утвердить модель полимеризации.

Существуют модели, предполагающие выпетливание ДНК (транс-модели, рис. 9B). Впервые предположение о таком механизме было выдвинуто в результате изучения активации MutH в присутствии MutS и MutL. В эксперименте «мисматч» находился на одной плазмиде, а участок 5'-Gm⁶ATC-3' / 3'-CTAG-5' – на другой. В контроле оба участка находились на одной и той же плазмиде. Эффективность гидролиза в обоих случаях совпала [152]. Более

того, в клетке редко встречается ДНК, свободная от белков. Обычно практически сразу после репликации она структурируется с участием белков, и в результате для скольжения MutS вдоль ДНК создаются помехи [115]. В пользу модели, включающей выпетливание ДНК, служат также данные, полученные методом атомно-силовой микроскопии. Эти данные указывают на значение тетрамеризации MutS в присутствии АТР [148, 155]. На микрофотографиях можно обнаружить два типа комплексов MutS с ДНК. Первый тип сформирован димером MutS с ДНК, а другой представляет собой петлю ДНК, образованную с участием двух димеров белка. Таким образом, происходит разделение гомодимеров MutS по функциям на две группы, где часть остается связанной с «мисматчем», а другая «протягивает» через себя ДНК, сохраняя контакт с первым димером. «Неподвижная» группа димеров MutS может быть результатом гидролиза АТР в одном из доменов димера. В рамки этого «комбинированного» механизма укладываются цис- и транс-механизмы процесса MMR.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время существуют различные взгляды на механизм MMR, поэтому продолжаются активные исследования в этой области. Выявление единичного «мисматча» среди многих тысяч канонических пар нуклеотидов в ДНК представляет собой уникальный процесс [155]. Методом флуоресцентного резонансного переноса энергии на уровне одной молекулы обнаружено множество конформаций белка MutS в присутствии канонических ДНК-лигандов [104].

Вместе с тем связывание белка MutS с ДНК в поиске «мисматча», представляющее собой ключевое событие процесса MMR, до сих пор не охарактеризовано полностью. Спорные моменты касаются не только короткоживущих промежуточных комплексов MutS с ДНК, но и более сложных комплексов: MutS–MutL–ДНК и MutS–MutL–MutH–ДНК. Для характеристики этих комплексов можно использовать сочетание различных оптических [95, 153, 154] и флуоресцентных [143] методов с кросслинкингом белков и белков с ДНК [140]. Перспективным представляется недавно предложенный подход к изучению короткоживущих комплексов, основанный на ковалентной фиксации MutS на ДНК [156].

Необходимы исследования структуры MutS в процессе сканирования ДНК. Полагают, что «мисматч»-связывающие домены из обеих субъединиц димера MutS теряют сродство к друг другу, тем самым канал белка, в котором находится ДНК, увеличивается в 2 раза [44]. Особенно сложную проблему представляет изучение взаимной координации белков системы MMR, а также влияние на их активность других клеточных белков. Очевидно, что для создания полной картины функционирования системы репарации MMR в живой клетке необходимы дальнейшие исследования. ●

*Работа поддержана РФФИ
(грант № 13-04-00615-а) и программой
РФФИ-ННИО «Международные исследовательские
группы с участием молодых ученых»
(грант № 11-04-91336-ННИО_а).*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Lewin B. Genes. Boston, MA: Jones Bartlett Publ., 2008. 892 p.
- Futreal P.A., Coin L., Marshall M., Down T., Hubbard T., Wooster R., Rahman N., Stratton M.R. // Nat. Rev. Cancer. 2004. V. 4. P. 177–183.
- Drake J.W. // Ann. N.Y. Acad. Sci. 1999. V. 870. P. 100–107.
- Айала Ф., Кайгер Дж. Современная генетика. М.: Мир, 1987. Т. 2. 368 с.
- Friedberg E.C., Walker G.C., Siede W. DNA repair and mutagenesis. Washington, D.C.: ASM Press, 1995. 698 p.
- O'Neil N., Rose A. // WormBook. 2006. P. 1–12.
- Koshland D.E. Jr. // Science. 1994. V. 266. P. 1925.
- Лаврик О.И. // Биохимия. 2011. Т. 76. С. 7.
- Buermeyer A.B., Deschênes S.M., Baker S.M., Liskay R.M. // Annu. Rev. Genet. 1999. V. 33. P. 533–564.
- Hsieh P. // Mutat. Res. 2001. V. 486. P. 71–87.
- Marti T.M., Kunz C., Fleck O. // J. Cell Physiol. 2002. V. 191. P. 28–41.
- Barnes D.E., Lindahl T. // Annu. Rev. Genet. 2004. V. 38. P. 445–476.
- Kunkel T.A., Erie D.A. // Annu. Rev. Biochem. 2005. V. 74. P. 681–710.
- Iyer R.R., Pluciennik A., Burdett V., Modrich P.L. // Chem. Rev. 2006. V. 106. P. 302–323.
- Jiricny J. // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2006. V. 7. P. 335–346.
- Fukui K. // J. Nucl. Acids. 2010. V. 2010. P. 1–16.
- Голясная Н.В., Цветкова Н.А. // Молекуляр. биология. 2006. Т. 40. С. 211–223.
- Modrich P. // Annu. Rev. Genet. 1991. V. 25. P. 229–253.
- Lichten M., Goyon C., Schultes N., Treco D., Szostak J.W., Haber J.E., Nicolas A. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1990. V. 87. P. 7653–7657.
- Reenan R.A., Kolodner R.D. // Genetics. 1992. V. 132. P. 975–985.
- Modrich P., Lahue R. // Annu. Rev. Biochem. 1996. V. 65. P. 101–133.
- Kolodner R.D., Marsischky G.T. // Curr. Opin. Genet. Dev. 1999. V. 9. P. 89–96.
- Branch P., Aquilina G., Bignami M., Karran P. // Nature. 1993. V. 362. P. 652–654.
- Duckett D.R., Drummond J.T., Murchie A.I.H., Reardon J.T., Sancar A., Lilley D.M.J., Modrich P. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1996. V. 93. P. 6443–6447.
- Ni T.T., Marsischky G.T., Kolodner R.D. // Mol. Cell. 1999. V. 4. P. 439–444.
- Mazurek A., Berardini M., Fishel R. // J. Biol. Chem. 2002. V. 277. P. 8260–8266.
- Li G.M., Wang H., Romano L.J. // J. Biol. Chem. 1996. V. 271.

- P. 24084–24088.
28. Feng W.Y., Lee E.H., Hays J.B. // *Genetics*. 1991. V. 129. P. 1007–1020.
29. Mu D., Tursun M., Duckett D.R., Drummond J.T., Modrich P., Sancar A. // *Mol. Cell. Biol.* 1997. V. 17. P. 760–769.
30. Wang H., Lawrence C.W., Li G.M., Hays J.B. // *J. Biol. Chem.* 1999. V. 274. P. 16894–16900.
31. Mello J.A., Acharya S., Fishel R., Essigmann P. // *Chem. Biol.* 1996. V. 3. P. 579–589.
32. Pabla N., Ma Z., McIlhatton M.A., Fishel R., Dong Z. // *J. Biol. Chem.* 2011. V. 286. P. 10411–10418.
33. Stojic L., Brun R., Jiricny J. // *DNA Repair (Amst.)*. 2004. V. 3. P. 1091–1101.
34. Greig D., Travisano M., Louis E.J., Borts R.H. // *J. Evol. Biol.* 2003. V. 16. P. 429–437.
35. Sia E.A., Kokoska R.J., Dominska M., Greenwell P., Petes T.D. // *Mol. Cell Biol.* 1997. V. 17. P. 2851–2858.
36. Wu B.P., Zhang Y.L., Zhou D.Y., Gao C.F., Lai Z.S. // *World J. Gastroenterol.* 2000. V. 6. P. 902–905.
37. Bechter O.E., Zou Y., Walker W., Wright W.E., Shay J.W. // *Cancer Res.* 2004. V. 64. P. 3444–3451.
38. Nguyen B., Elmore L.W., Holt S.E. // *Cancer Biol. Ther.* 2004. V. 3. P. 293–295.
39. Evans E., Alani E. // *Mol. Cell. Biol.* 2000. V. 20. P. 7839–7844.
40. Schanz S., Castor D., Fischer F., Jiricny J. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2009. V. 106. P. 5593–5598.
41. Chahwan R., Edelmann W., Scharff M.D., Roa S. // *Biomed. Pharmacother.* 2011. V. 65. P. 529–536.
42. Aravind L., Walker D.R., Koonin E. // *Nucl. Acids Res.* 1999. V. 27. P. 1223–1242.
43. Michailidi C., Papavassiliou A.G., Troungos C. // *Curr. Mol. Med.* 2012. V. 12. P. 237–246.
44. Qiu R., DeRocco V. C., Harris C., Sharma A., Hingorani M.M., Erie D.A., Weninger K.R. // *EMBO J.* 2012. V. 31. P. 2528–2540.
45. Jiricny J., Nystrom-Lahti M. // *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2000. V. 10. P. 157–161.
46. Harfe B.D., Jinks-Robertson S. // *Annu. Rev. Genet.* 2000. V. 34. P. 359–399.
47. Peltomäki P. // *J. Clin. Oncol.* 2003. V. 21. P. 1174–1179.
48. Reuschenbach M., Kloor M., Morak M., Wentzensen N., Germann A., Garbe Y., Tariverdian M., Findeisen P., Neumaier M., Holinski-Feder E., et al. // *Fam. Cancer*. 2010. V. 9. P. 173–179.
49. Lahue R.S., Au K.G., Modrich P. // *Science*. 1989. V. 245. P. 160–164.
50. Balganesch T.S., Lacks S.A. // *J. Bacteriol.* 1985. V. 162. P. 979–984.
51. Radman M., Wagner R. // *Annu. Rev. Genet.* 1986. V. 20. P. 523–538.
52. Li G.M. // *Cell Res.* 2008. V. 18. P. 85–98.
53. Zhao J., Winkler M.E. // *J. Bacteriol.* 2000. V. 182. P. 5025–5028.
54. Fourrier L., Brooks P., Malinge J.M. // *J. Biol. Chem.* 2003. V. 278. P. 21267–21275.
55. Lamers M.H., Perrakis A., Enzlin J.H., Winterwerp H.H.K., de Wind N., Sixma T.K. // *Nature*. 2000. V. 407. P. 711–717.
56. Wildenberg J., Meselson M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1975. V. 72. P. 2202–2206.
57. Wagner R., Meselson M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1976. V. 73. P. 4135–4139.
58. Lyons S.M., Schendel F. // *J. Bacteriol.* 1984. V. 159. P. 421–423.
59. Duppatla N.J., Rao D.N. // *Prog. Nucl. Acid Res. Mol. Biol.* 2006. V. 81. P. 1–49.
60. Lu A.-L., Clark S., Modrich P. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1983. V. 80. P. 4639–4643.
61. Glickman B.W. // *Mutat. Res.* 1979. V. 61. P. 153–162.
62. Marinus M.G., Poteete A., Arraj J.A. // *Gene*. 1984. V. 28. P. 123–125.
63. Gorman J., Chowdhury A., Surtees J.A., Shimada J., Reichman D.R., Alani E., Greene E.C. // *Mol. Cell*. 2007. V. 28. P. 359–370.
64. Nishant K.T., Plys A.J., Alani E. // *Genetics*. 2008. V. 179. P. 747–755.
65. Claverys J.-P., Mejean P., Gasc A.-M., Sicard A.M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1983. V. 80. P. 5956–5960.
66. Yamaguchi M., Dao V., Modrich P. // *J. Biol. Chem.* 1998. V. 273. P. 9197–9201.
67. Mechanic L.E., Frankel B.A., Matson S.W. // *J. Biol. Chem.* 2000. V. 275. P. 38337–38346.
68. Matson S.W., Robertson A.B. // *Nucl. Acids Res.* 2006. V. 34. P. 4089–4097.
69. Cooper D.L., Lahue R.S., Modrich P. // *J. Biol. Chem.* 1993. V. 268. P. 11823–11829.
70. Viswanathan M., Burdett P., Baitinger C., Modrich P., Lovett S.T. // *J. Biol. Chem.* 2001. V. 276. P. 31053–31058.
71. Han E.S., Cooper D.L., Persky N.S., Sutter V.A. Jr., Whitaker R.D., Montello M.L., Lovett S.T. // *Nucl. Acids Res.* 2006. V. 34. P. 1084–1091.
72. Lohman T.M., Ferrari M.E. // *Annu. Rev. Biochem.* 1994. V. 63. P. 527–570.
73. Bjornson K.P., Blackwell L.J., Sage H., Baitinger C., Allen D., Modrich P. // *J. Biol. Chem.* 2003. V. 278. P. 34667–34673.
74. Kang J., Huang S., Blaser M.J. // *J. Bacteriol.* 2005. V. 187. P. 3528–3537.
75. Snowden T., Acharya S., Butz C., Berardini M., Fishel R. // *Mol. Cell*. 2004. V. 15. P. 437–451.
76. Hollingsworth N.M., Ponte L., Halsey C. // *Genes Dev.* 1995. V. 9. P. 1728–1739.
77. Culligan K.M., Meyer-Gauen G., Lyons-Weiler J., Hays J.B. // *Nucl. Acids Res.* 2000. V. 28. P. 463–471.
78. Obmolova G., Ban C., Hsieh P., Yang W. // *Nature*. 2000. V. 407. P. 703–710.
79. Junop M.S., Obmolova G., Rausch K., Hsieh P., Yang W. // *Mol. Cell*. 2001. V. 7. P. 1–12.
80. Lamers M.H., Winterwerp H.H.K., Sixma T.K. // *EMBO J.* 2003. V. 22. P. 746–756.
81. Natrajan G., Lamers M.H., Enzlin J.H., Winterwerp H.H.K., Perrakis A., Sixma T.K. // *Nucl. Acids Res.* 2003. V. 31. P. 4814–4821.
82. Alani E., Lee J.Y., Schofield M.J., Kijas A.W., Hsieh P., Yang W. // *J. Biol. Chem.* 2003. V. 278. P. 16088–16094.
83. Lebbink J.H.G., Fish A., Reumer A., Natrajan G., Winterwerp H.H.K., Sixma T.K. // *J. Biol. Chem.* 2010. V. 285. P. 13131–13141.
84. Lebbink J.H.G., Georgijevic D., Natrajan G., Fish A., Winterwerp H.H.K., Sixma T.K., de Wind N. // *EMBO J.* 2006. V. 25. P. 409–419.
85. Lamers M.H., Georgijevic D., Lebbink J.H., Winterwerp H.H.K., Agianian B., de Wind N., Sixma T.K. // *J. Biol. Chem.* 2004. V. 279. P. 43879–43885.
86. Warren J.J., Pohlhaus T.J., Changela A., Iyer R.R., Modrich P.L., Beese L.S. // *Mol. Cell*. 2007. V. 26. P. 579–592.
87. Jiricny J. // *Curr. Biol.* 2000. V. 10. P. R788–790.
88. Biswas I., Hsieh P. // *J. Biol. Chem.* 1997. V. 272. P. 13355–13364.
89. Sixma T.K. // *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2001. V. 11. P. 47–52.
90. Yamamoto A., Schofield M.J., Biswas I., Hsieh P. // *Nucl. Acids Res.* 2000. V. 28. P. 3564–3569.
91. Junop M.S., Yang W., Funchain P., Clendenin W., Miller J.H. // *DNA Repair (Amst.)*. 2003. V. 2. P. 387–405.

92. Hunter W.N., Brown T., Kneale G., Anand N.N., Rabinovich D., Kennard O. // *J. Biol. Chem.* 1987. V. 262. P. 9962–9970.
93. Skelly J., Edwards K.J., Jenkins T.C., Neidle S. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1993. V. 90. P. 804–808.
94. Werntges H., Steger G., Riesner D., Fritz H.J. // *Nucl. Acids Res.* 1986. V. 14. P. 3773–3790.
95. Wang H., Yang Y., Schofield M.J., Du C., Fridman Y., Lee S.D., Larson E.D., Drummond J.T., Alani E., Hsieh P., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2003. V. 100. P. 14822–14827.
96. Hirano M., Hirano T. // *EMBO J.* 2002. V. 21. P. 5733–5744.
97. Verdon G., Albers S., van Oosterwijk N., Dijkstra B.W., Driessen A.J., Thunnissen A.M. // *J. Mol. Biol.* 2003. V. 334. P. 255–267.
98. Gradia S., Subramanian D., Wilson T., Acharya S., Makhov A., Griffith J., Fishel R. // *Mol. Cell.* 1999. V. 3. P. 255–261.
99. Joshi A., Rao B.J. // *Biochemistry.* 2002. V. 41. P. 3654–3666.
100. Hess M.T., Gupta R.D., Kolodner R.D. // *J. Biol. Chem.* 2002. V. 277. P. 25545–25553.
101. Joseph N., Duppatla V., Rao D.N. // *Prog. Nucl. Acid Res. Mol. Biol.* 2006. V. 81. P. 1–49.
102. Antony E., Hingorani M.M. // *Biochemistry.* 2004. V. 43. P. 13115–13128.
103. Calmann M.A., Nowosielska A., Marinus M.G. // *Nucl. Acids Res.* 2005. V. 33. P. 1193–1200.
104. Jeong C., Cho W.K., Song K.M., Cook C., Yoon T.Y., Ban C., Fishel R., Lee J.B. // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2011. V. 18. P. 379–385.
105. Cheng X., Blumenthal R.M. // *Structure.* 1996. V. 4. P. 639–645.
106. Bischerour J., Chalmers R. // *PLoS One.* 2009. V. 4. e6201. doi: 10.1371/journal.pone.0006201.
107. Gradia S., Acharya S., Fishel R. // *Cell.* 1997. V. 91. P. 995–1005.
108. Fishel R. // *Genes Dev.* 1998. V. 12. P. 2096–2101.
109. Antony E., Hingorani M.M. // *Biochemistry.* 2003. V. 42. P. 7682–7693.
110. Martik D., Baitinger C., Modrich P. // *J. Biol. Chem.* 2004. V. 279. P. 28402–28410.
111. Drotschmann K., Hall M.C., Shcherbakova P.V., Wang H., Erie D.A., Brownell F.R., Kool E.T., Kunkel T.A. // *Biol. Chem.* 2002. V. 383. P. 969–975.
112. Kijas A.W., Studamire B., Alani E. // *J. Mol. Biol.* 2003. V. 331. P. 123–138.
113. Acharya S., Foster P.L., Brooks P., Fishel R. // *Mol. Cell.* 2003. V. 12. P. 233–246.
114. Bowers J., Sokolsky T., Quach T., Alani E. // *J. Biol. Chem.* 1999. V. 274. P. 16115–16125.
115. Mukherjee S., Law S.M., Feig M. // *Biophys. J.* 2009. V. 96. P. 1707–1720.
116. Polosina Y.Y., Cupples C.G. // *Mutat. Res.* 2010. V. 705. P. 228–238.
117. Zhao N., Zhu F., Yuan F., Haick A.K., Fukushige S., Gu L., Her C. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2008. V. 370. P. 338–343.
118. Dherin C., Gueneau E., Francin M., Nunez M., Miron S., Liberti S.E., Rasmussen L.J., Zinn-Justin S., Gilquin B., Charbonnier J.B., et al. // *Mol. Cell. Biol.* 2009. V. 29. P. 907–918.
119. Kanao R., Hanaoka F., Masutani C. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2009. V. 389. P. 40–45.
120. Bende S.M., Grafstrom R.H. // *Nucl. Acids Res.* 1991. V. 19. P. 1549–1555.
121. Grilley M., Welsh K.M., Su S.S., Modrich P. // *J. Biol. Chem.* 1989. V. 264. P. 1000–1004.
122. Ban C., Junop M., Yang W. // *Cell.* 1999. V. 97. P. 85–97.
123. Ban C., Yang W. // *Cell.* 1998. V. 95. P. 541–552.
124. Hu X., Machius M., Yang W. // *FEBS Lett.* 2003. V. 544. P. 268–273.
125. Guarné A., Ramon-Maiques S., Wolff E.M., Ghirlando R., Hu X., Miller J.H., Yang W. // *EMBO J.* 2004. V. 23. P. 4134–4145.
126. Pillon M.C., Lorenowicz J.J., Uckelmann M., Klocko A.D., Mitchell R.R., Chung Y.S., Modrich P., Walker G.C., Simmons L.A., Friedhoff P., Guarné A. // *Mol. Cell.* 2010. V. 39. P. 145–511.
127. Namadurai S., Jain D., Kulkarni D.S., Tabib C.R., Friedhoff P., Rao D.N., Nair D.T. // *PloS One.* 2010. V. 5. e13726.
128. Kosinski J., Steindorf I., Bujnicki J.M., Giron-Monzon L., Friedhoff P. // *J. Mol. Biol.* 2005. V. 351. P. 895–909.
129. Jones D.T. // *J. Mol. Biol.* 1999. V. 292. P. 195–202.
130. Jun S.H., Kim T.G. // *FEBS J.* 2006. V. 273. P. 1609–1619.
131. Sacho E.J., Kadyrov F.A., Modrich P., Kunkel T.A., Erie D.A. // *Mol. Cell.* 2008. V. 29. P. 112–121.
132. Spampinato C., Modrich P. // *J. Biol. Chem.* 2000. V. 275. P. 9863–9869.
133. Giron-Monzon L., Manelyte L., Ahrends R., Kirsch D., Spengler B., Friedhoff P. // *J. Biol. Chem.* 2004. V. 279. P. 49338–49345.
134. Schofield M.J., Hsieh P. // *Annu. Rev. Microbiol.* 2003. V. 57. P. 579–608.
135. Robertson A., Pattishall S.R. // *J. Biol. Chem.* 2006. V. 281. P. 8399–8408.
136. Kadyrov F.A., Dzantiev L. // *Cell.* 2006. V. 126. P. 297–308.
137. Ban C., Yang W. // *EMBO J.* 1998. V. 17. P. 1526–1534.
138. Yang W. // *Mutat. Res.* 2000. V. 460. P. 245–256.
139. Friedhoff P., Thomas E., Pingoud A. // *J. Mol. Biol.* 2003. V. 325. P. 285–297.
140. Lee J.Y., Chang J. // *Mol. Cell.* 2005. V. 20. P. 155–166.
141. Toedt G.H., Krishnan R., Friedhoff P. // *Nucl. Acids Res.* 2003. V. 31. P. 819–825.
142. Polosina Y.Y., Cupples C.G. // *BioEssays.* 2010. V. 32. P. 51–59.
143. Mendillo M.L., Hargreaves V.V., Jamison J.W., Mo A.O., Li S., Putnam C.D., Woods V.L. Jr., Kolodner R.D. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2009. V. 106. P. 22223–22228.
144. Winkler I., Marx A.D., Lariviere D., Heinze R.J., Cristovao M., Reumer A., Curth U., Sixma T.K., Friedhoff P. // *J. Biol. Chem.* 2011. V. 286. P. 17326–17337.
145. Kolodner R.D., Mendillo M.L., Putnam C.D. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2007. V. 104. P. 12953–12964.
146. Pluciennik A., Modrich P. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2007. V. 104. P. 12709–12713.
147. Dzantiev L., Constantin N., Genschel J., Iyer R.R., Burgers M., Modrich P. // *Mol. Cell.* 2004. V. 15. P. 31–41.
148. Allen D.J., Makhov A., Grilley M., Taylor J., Thresher R., Modrich P., Griffith J.D. // *EMBO J.* 1997. V. 16. P. 4467–4476.
149. Blackwell L.J., Martik D., Bjornson K., Bjornson E.S., Modrich P.J. // *Biol. Chem.* 1998. V. 273. P. 32055–32062.
150. Blackwell L.J., Wang S., Modrich P. // *J. Biol. Chem.* 2001. V. 276. P. 33233–33240.
151. Mazur D.J., Mendillo M.L., Kolodner R.D. // *Mol. Cell.* 2006. V. 22. P. 39–49.
152. Schofield M.J., Nayak S., Scott T.H., Du C., Hsieh P. // *J. Biol. Chem.* 2001. V. 276. P. 28291–28299.
153. Modrich P. // *Annu. Rev. Biochem.* 1987. V. 56. P. 435–466.
154. Elez M., Radman M., Matic I. // *Nucl. Acids Res.* 2012. V. 40. P. 3929–3938.
155. Jiang Y., Marszalek E. // *EMBO J.* 2011. V. 30. P. 2881–2893.
156. Heinze R.J., Sekerina S., Winkler I., Biertümpfel C., Oretskaya T.S., Kubareva E., Friedhoff P. // *Mol. Biosyst.* 2012. V. 8. P. 1861–1864.