

Р.Б. Азнабаева<sup>1</sup>, А.М. Тургимбаева<sup>2</sup>, Ұ.Ө. Зейн<sup>2</sup>, С.К. Абельденов<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Казахский агротехнический университет имени С. Сейфуллина, Нур-Султан, Казахстан;

<sup>2</sup>Национальный центр биотехнологии, Нур-Султан, Казахстан

\*Автор для корреспонденции: abeldenov@gmail.com

## Пептидные последовательности для белок-белковых взаимодействий скользящего зажима

Антибиотическая резистентность патогенных микроорганизмов на сегодняшний день становится все более опасной проблемой во всем мире, вместе с тем возрастает необходимость в разработке новых антибактериальных мишеней. С момента открытия скользящих зажимов у бактерий было проведено большое количество исследований, в ходе которых открылись его неповторимые свойства — способность связываться с ДНК и увеличивать активность и эффективность белков репараций и репликации, что подчеркивает его большую роль в поддержании устойчивости бактерий к повреждениям ДНК. В настоящий момент количество белков-партнеров, с которыми скользящий зажим способен создавать функциональные комплексы продолжает расти, и потому β-зажим является объектом для внимания как потенциальное решение для поиска новых антибиотиков. В обзорной статье приведены некоторые исследования, освещающие его строение, структуру и механизм действия, а также его способность образовывать комплексы со многими белками-партнерами с помощью уникального мотива связывания β-зажима, который является консервативным и аналогичен для всех белков-партнеров.

*Ключевые слова:* β-зажим, бактерия, антибиотики, репарация, белки, устойчивость, ДНК, резистентность патогенных микроорганизмов.

### Введение

Скользящий зажим — это особый олигомерный белковый комплекс, являющийся субъединицей ДНК-полимеразы и имеющий форму кольца молекулярной массой ~82 кДа [1–3]. Они обнаружены практически у всех организмов, включая некоторые вирусы, и называются ядерным антигеном пролиферирующих клеток (PCNA) у эукариот и β-зажимом у прокариот [4]. И хотя во всех этих трех структурах жизни кольцевые зажимы не имеют гомологии в аминокислотных последовательностях, по строению и структуре они практически идентичны. У бактерий скользящий зажим является димером, он состоит из двух β-субъединиц, откуда и получил свое название β-зажим. У архей и эукариот зажимы являются тримером из трёх молекул PCNA. Фаг T 4 также имеет тримерную структуру зажима и называется gp45 [5].

По своей природе скользящие зажимы являются важнейшим кофактором процессивности полимеразы, увеличивая скорость присоединения нуклеотидов к растущей цепи в тысячи раз. Во время репликации ДНК необходимо точно синтезировать до миллиарда нуклеотидов за короткий период времени, но связь между полимеразой и матрицей достаточно неустойчива и потому репликативные ДНК-полимеразы сами по себе непрерывно синтезируют всего несколько нуклеотидов, прежде чем отпадают из матрицы. Чтобы увеличить степень процессивности для эффективной репликации, ДНК-полимеразы связываются с кольцевыми скользящими зажимами, которые при помощи своей кольцевой формы способны плотно охватить матричную ДНК и крепко удерживать полимеразу, тем самым предотвращая ее диссоциацию от ДНК. Это также указывает на то, что белок — белковое взаимодействие между ДНК, скользящим зажимом и полимеразой более специфично по сравнению с тем, когда ДНК взаимодействует только с полимеразой. Однако, несмотря на это, скользящий зажим, в отличие от других субъединиц, не прикреплен к полимеразе на постоянной основе [4].

Для того, чтобы загрузить замкнутую кольцевую структуру скользящего зажима на ДНК, необходим специальный механизм, способный катализировать временное открытие, сборку и замыкание вокруг ДНК. Такую работу выполняет мультисубъединичный фермент из семейства АТФаз-погрузчик β-зажима (clamp loader). Погрузчик скользящих зажимов (фактор репликации C у эукариот) использует АТФ для размыкания скользящих зажимов и размещения их вокруг 3'-конца матрицы. Помимо этого, погрузчик β-зажимов направляет их на участки инициации синтеза ДНК, а также помогает во взаимодействии β-зажима с ДНК-полимеразами [5].

Не так давно ряд открытий позволил узнать, что, помимо взаимодействия с полимеразой, скользящие зажимы могут участвовать в процессах репликации, модификации и репарации ДНК, связываясь и с другими белками на ДНК (помимо PolS). Опосредует эту связь у белков-партнеров линейный мотив, состоящий из пяти аминокислотных остатков с консенсусной последовательностью QL[SD]LF [1–3].

#### Универсальный СВМ-мотив у прокариот

С  $\beta$ -зажимом образуют комплекс многие репарационные и полимеразные белки, такие как DnaE, PolC, PolIV (DinB), PolV, PolI, MutS, UmuC, DinB1, MutL, XthA, ДНК лигаза и Hda. Все эти белки имеют универсальный  $\beta$ -зажим-связывающий мотив (clamp-binding motif, СВМ) с консенсусной последовательностью QL [SD] LF, чаще всего расположенный на С- или N- концах и иногда внутри белка. Данный мотив играет решающую роль в образовании стабильных физических и функциональных связей с  $\beta$ -зажимом. Главным образом, это гидрофобные ароматические аминокислоты, которые связываются с комплементарными остатками, преимущественно на пептид-связывающем кармане (PBG) и реже на С-конце кольцевого зажима [6].

В работе [6] авторы выравнивали области, содержащие консенсусные аминокислотные последовательности 250 белков-партнеров кольцевого зажима. Белки-партнеры относились к 6 разным семействам PolB (15 примеров), PolC (22 примера), DnaE1 (72 примера), DinB1 (62 примера), UmuC (20 примеров) и MutS1 (59 примеров) эубактерий, эукариот и архей. Результат показал некоторое сходство между связывающими мотивами эубактериальных и эукариотических систем. Подчеркивается наличие высокого уровня сохранения Gln в первой позиции — данная аминокислота встречалась с частотой 76,4 %, и очень редко заменялась Glu (1,6 %), далее Leu, которая встречалась в 41,6 % во второй позиции, в третьей позиции это были Ser (34 %) и Asp (22,8 %), четвертая и пятая позиции отдавали предпочтение Leu (81,2 %) и Phe (76,8 %). Таким образом, авторы вывели консенсусную последовательность — QL [SD] LF. Примечательно то, что белок репарации ошибочного спаривания MutS1 не содержит совпадений с СВМ-мотивом, в то время как его эукариотический аналог способен связываться с PCNA [6– 8].

В исследовании [9] авторы создавали *in vivo* и *in vitro* комплексы между эндонуклеазой MtbXthA и зажимом Mtb $\beta$ -Clamp. XthA участвуют в начальной и конечной стадиях эксцизионной репарации оснований бактериальной ДНК (BER). В ходе выравнивания последовательностей MtbXthA с его AP-эндонуклеазными гомологами у других бактерий рядом с сайтом связывания ДНК был установлен мотив 239QLRFPKK245, который соответствовал консенсусной последовательности в работе [6]. Для его подтверждения авторы использовали мутант MtbXthAPIP, который содержал мутацию F242S в предполагаемом мотиве. С помощью флуоресцентного анализа была измерена его аффинность связывания с Mtb $\beta$ -Clamp, впоследствии чего авторы наблюдали уменьшение степени сродства между белками. Это подтвердило, что предполагаемый мотив, а именно F242, играет важную роль во взаимодействии между двумя белками, и наличие мутации в данном мотиве нарушает связывание. Кроме того, эксперимент при стандартных условиях реакции со стимуляцией эндонуклеазной и экзонуклеазной активности MtbXthA посредством добавления Mtb $\beta$ -Clamp показал, что кольцевой зажим приводит к 75 % расщеплению ДНК субстрата при эндонуклеазной активности, а без кольцевого зажима — MtbXthA расщеплял субстрат на 15 %. При экзонуклеазной активности MtbXthA в комплексе с кольцевым зажимом расщеплял субстрат на 65 %, без кольцевого зажима лишь на 11 %. Еще один проведенный эксперимент в этой работе также показал, что Mtb $\beta$ -Clamp способен взаимодействовать с MtbXthA, как через бороздку связывания пептида (PBG), локализованный у Mtb $\beta$ -Clamp на субсайте I, так и через С-конец субсайта III. Так, в присутствии ДНК-субстрата комплекс образовался непосредственно через С-конец, в отсутствие ДНК белки взаимодействовали через PBG, что указывает на то, что у  $\beta$ -Clamp, как и у его эукариотического аналога PCNA есть множественные способы взаимодействия с белками-партнерами [9].

В исследованиях, где каталитическая субъединица ДНК-полимеразы V транслезионного синтеза-UmuC *E. coli* взаимодействует с  $\beta$ -зажимом, был подтвержден СВМ-мотив-357QLNLF361, который ранее был идентифицирован в [6]. UmuC в комплексе с UmuD<sub>2</sub> образуют «склонную к ошибкам» ДНК-полимеразу V, являющуюся важнейшей частью SOS-системы и обладающей сильным мутагенным потенциалом, который, в свою очередь, обеспечивает устойчивость бактерий к антибиотикам. Линейное выравнивание показало, что у PolV предполагаемый мотив находится внутри белка, а не на С-конце. Для его подтверждения авторы инкубировали синтетический меченый пептид, содержащий

СВМ-мотив–357QLNLF361 с  $\beta$ -зажимом, впоследствии чего образованный комплекс был кристаллизирован и идентифицирован методом гель-фильтрации. Сравнение мотивов связывания кольцевого зажима у Pol II, Pol III, Pol IV с UmuC показало, что UmuC демонстрирует уникальное различие: в отличие от других полимераз, его консервативный Phe-361 не попадает в пептид-связывающий карман зажима, но это компенсируется взаимодействием между Asn-359 из UmuC и Arg-152 на поверхности зажима, так как при связывании данные остатки находятся близко друг к другу. Они предполагают, что существующие множественные вариации связывания кольцевого зажима мотивом у разных полимераз опосредуется остатками на поверхности именно кольцевого зажима, и напрямую это связано с присутствием ДНК [10].

В исследованиях взаимодействия  $\beta$ -зажима с ДНК-лигазой у *Helicobacter pylori*, рядом с С-концом белка был идентифицирован мотив 554QEFIRSLF561, соответствующий консенсусной последовательности. ДНК-лигазы играют одну из ключевых ролей в системах репликаций и репараций ДНК, как у прокариот, так и у эукариот, и, в отличие от эукариотической лигазы, во взаимодействии с PCNA роль кольцевого зажима во взаимодействиях с ДНК-лигазой у бактерий плохо изучена. Для подтверждения существования связи авторы кристаллизовали H $\beta$ -clamp с синтетическим пептидом, содержащим предполагаемый мотив 554QEFIRSLF56 из ДНК-лигазы. Результат показал наличие комплекса и то, что он так же, как и большинство белков, опосредуется преимущественно гидрофобными остатками. Авторы отметили важность таких остатков на мотиве, как Ile557, Leu560 и Phe561, подчеркивая, что именно они взаимодействуют с PBG кольцевого зажима. Примечательно то, что ранее аналогичный эксперимент на наличие комплекса MtbLigA-Mtb $\beta$ -clamp белков у *M. tuberculosis* не нашел подтверждения [11].

Результаты анализа взаимодействия  $\beta$ -зажима и белком негативной регуляции инициации репликации Hda (белок, родственник DnaA) у *E. coli* подтвердили, что Hda напрямую связывается с  $\beta$ -зажимом через идентифицированный консенсусный СВМ-мотив QL [SP] LPL, который ранее был так же идентифицирован в [6]. Выравнивание остатков показало то, что, в отличие от большинства других белков, предполагаемый мотив у белков семейства Hda располагается преимущественно на N-конце. Для того, чтобы доказать является ли выделенный мотив связующим кольцевой зажим, авторы индуцировали мутации на гексапептиде Hda: заменили QLSLPL на QASAPA в первом мутанте и QLSLPL на QLSAAL во втором мутанте. Результаты показали, что данные замены нарушали способность Hda связываться с кольцевым зажимом. Во втором эксперименте были использованы синтетические пептиды, содержащие мотив, аналогичный гексапептиду мотива Hda. Авторы предполагали, что данные пептиды будут конкурировать за кольцевой зажим с Hda, тем самым нарушая способность последних образовывать комплекс. В результате было достигнуто 50 % ингибирование связывания между Hda и  $\beta$ -зажимом, подтверждающим то, что мотив является  $\beta$ -связующим [12].

#### PCNAPIP-мотив у эукариот

У эукариот и архей ядерный антиген пролиферирующих клеток (proliferating cell nuclear antigen, PCNA) собирается в гомотримерные кольца, каждый протомер состоит из двух идентичных доменов, соединенных междоменной соединительной петлей (IDCL) [5, 13]. PCNA, как и его аналог у бактерий, взаимодействует с белками-партнерами посредством связывания через PIP-мотив (PCNA-interacting protein motif, PIP-box). У PCNA их несколько, это канонический PIP-мотив — QxxHxxAA, где H — это алифатический гидрофобный остаток (чаще всего I, L или M); A — ароматический гидрофобный остаток (F, W или Y); x — любая аминокислота [14, 15]. У некоторых белков репарации и репликации был идентифицирован новый мотив, взаимодействующий с PCNA, который получил название KAbox. Данный мотив встречается реже других и состоит из остатков KA-(A / L / I) — (A / L / Q) — x x — (L / V) [16, 17].

В исследовании [18] авторы идентифицировали новый альтернативный мотив взаимодействия с PCNA—APIM (R / K- F / W / Y- L / I / V / A- L / I / V / A- K / R). Он содержит до 10 N-концевых аминокислот с высококонсервативным Phe и широко распространен так же, как и классический PIP-мотив, но, в отличие от классического PIP-мотива, который присутствует во многих белках репликации ДНК, APIM чаще встречается в репарационных белках, а также у белков, участвующих в контроле клеточного цикла [18]. Как и классический мотив, APIM связывается с PCNA, через его консервативный пептид-связывающий карман, который находится ниже междоменной соединительной петли (IDCL) [19, 20].

Сам белковый кольцевой зажим PCNA, в отличие от бактериального  $\beta$ -зажима, для взаимодействия с PIP-мотивом имеет три идентичных по структуре и функционированию пептид-связывающих карманов (PBG). Каждый карман находится по одному на каждом мономере белка, и потому PCNA способен одновременно связывать три разных лиганда [21].

#### *Загрузчик зажима*

Скользящие зажимы не могут свободно связываться с ДНК из-за своей замкнутой кольцевой формы [1, 22, 23], для этого им требуются АТФ-зависимые комплексы — загрузчики зажимов. Будучи членами AAA+ суперсемейства АТФаз, проявляя моторную и геликазную активность и способность разбирать белковые комплексы, загрузчики зажимов катализируют раскрытие скользящего зажима, загружают их на ДНК и замыкают кольцо вокруг него. У эукариот и архей загрузчик зажимов называется фактор репликации С (RFC), у бактерий — это комплекс  $\gamma/\tau$ , а у вирусов — gp44/62 [24, 25]. Обычно AAA+ АТФазы создают гексамерные комплексы, но в комплексе  $\beta$ -зажимом загрузчик зажимов является пентамером. В отсутствие АТФ загрузчики зажима очень слабо взаимодействуют с кольцевыми зажимами, а при связывании АТФ они претерпевают конформационные изменения, которые обеспечивают оптимальное взаимодействие с С-концевой поверхностью зажима и способствуют его последующему раскрытию [26, 27].

Загрузчик бактериального зажима состоит из трех субъединиц —  $\delta$ ,  $\delta'$  и  $\gamma/\tau$ , которые собираются в гетеропентамер  $\delta\delta'(\gamma/\tau)$  [26, 28–31]. Хотя субъединицы  $\gamma$  и  $\tau$  кодируются одним и тем же геном, однако субъединица  $\tau$  не участвует при загрузке зажима, и его урезание трансляционным сдвигом рамки считывания дает субъединицу  $\gamma$ . Таким образом, зажимный загрузчик, состоящий из  $\delta\delta'\gamma$ , носит название  $\gamma$ -комплекс. Каждая субъединица  $\gamma$ -комплекса имеет одинаковую архитектуру, состоящую из трех отдельных доменов [26]. Субъединицы всего  $\gamma$ -комплекса связываются с  $\beta$ -зажимом, но  $\delta$ -субъединица является основной точкой контакта и отвечает за раскрытие кольца. В отсутствие АТФ  $\delta$ -субъединица спрятана внутри  $\gamma$ -комплекса, и связана с соседней  $\delta'$ -субъединицей. При связывании АТФ взаимодействие между  $\delta$  и  $\delta'$  нарушается, подставляя  $\delta$  для связи с С-концевой поверхностью закрытого  $\beta$ -зажима. Далее СВМ-мотив на  $\delta$ -субъединице впоследствии связывается с любым пептид-связывающим карманом на зажиме, дестабилизирует и открывает  $\beta$ -зажимное кольцо. После этого данный комплекс с открытым кольцевым зажимом специфически распознает и связывает ДНК, потом происходит гидролиз АТФ, который возвращает загрузчик зажима в низкоафинное состояние, которое приводит к его отсоединению, оставляя ДНК внутри раскрытого кольца. После отсоединения загрузчика электростатические взаимодействия между положительно заряженной внутренней поверхностью кольца скользящего зажима и отрицательно заряженной ДНК приводят к закрытию скользящего зажима вокруг ДНК [32–35].

#### *Петля междоменного соединителя*

$\beta$ -зажим представляет собой димер, каждый мономер которого состоит из трех глобулярных доменов [1]. Между доменами каждого мономера есть по четыре петли междоменного соединителя (Inter-domain connector loop, IDCL). Димерное сопряжение состоит из связи  $\beta$ -нити имеющих принцип соединения «голова к хвосту», в результате чего образуется кольцевая форма. Область пептид-связывающего кармана, взаимодействующего с СВМ-мотивом, находится возле IDCL доменов II и III (см. рис.). Данный карман состоит из двух субсайтов: субсайта I между доменами II и III, глубина  $\sim 8 \text{ \AA} \times 10 \text{ \AA}$  и  $8,5 \text{ \AA}$ , и в домене III менее глубокого  $\sim 4,5 \text{ \AA}$ -субсайта II.

Каноническим мотивом пептидного взаимодействия является QL [SD] LF, где остатки LF связываются с субсайтом I пептид-связывающего кармана на втором домене, в то время как QL ориентированы на субсайт 2 пептид-связывающего кармана в третьем домене [36–39].

На рисунке ниже представлены архитектурные различия в прокариотических и эукариотических ДНК-зажимах, области связывания белка на зажимах. Доменная архитектура скользящих зажимов ДНК: (I) прокариотический мономер  $\beta$ -зажима PCNA состоит из 3 доменов, каждый из которых соединен петлей междоменного коннектора (IDCL). (II) димер бактериального зажима. Каждая субъединица здесь окрашена по-разному. Области взаимодействия с белками на зажиме показаны красным и голубым цветами. Красным отмечен субсайт I, а голубым — субсайт II на С-конце. Вместе они являются пептид-связывающим карманом (PBG). (III) зажим эукариотической ДНК, мономер ядерного антигена пролиферирующих клеток (PCNA), состоит из двух доменов, соединенных IDCL.

(IV) PCNA человека является тримером. Области, взаимодействующие с белками, также обозначены как субсайт I (красный) и субсайт II (голубой) [9].

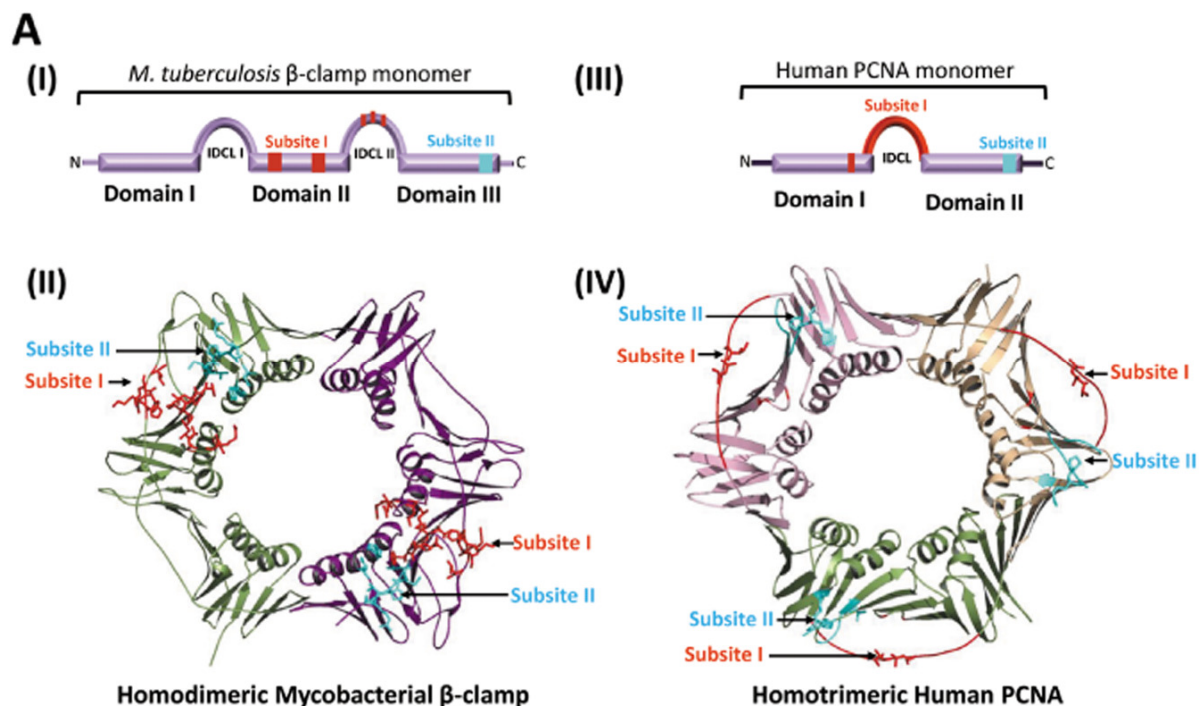


Рисунок. Архитектурные различия в прокариотических и эукариотических ДНК-зажимах, области связывания белка на зажимах

### Заключение

Бактериальная реплисома является важным объектом для разработки новых антибиотиков для борьбы с лекарственно-устойчивыми штаммами, и бактериальные  $\beta$ -зажимы вызвали большой интерес как потенциальные мишени для антибактериальной терапии, поскольку являются важным компонентом репликативного и репарационного механизма: все пять ДНК-полимераз, включая множество других белков-партнеров, число которых продолжает расти, взаимодействуют с одним и тем же сайтом на зажиме, и, что особенно важно, ингибиторы связывания прокариотических белков не влияют на взаимодействия эукариотических PCNA-связывающих партнеров из-за отсутствия гомологии в последовательностях. Отсюда следует, что поиск новых белков партнеров, способных создавать комплексы с кольцевым зажимом через уникальные пептидные последовательности, — довольно актуальное направление в научной среде. Мы уже увидели, то, что остатки Leu и Phe этих последовательностей являются неотъемлемой частью связывающего взаимодействия. Рациональный дизайн ингибиторов пептид-связывающего кармана на основе таких тонких аспектов связывания мотивом может привести к разработке, как антибиотиков широкого спектра, так и видоспецифичных антибиотиков.

Исследование в первую очередь делает вклад не только для дальнейшего понимания внутриклеточных механизмов бактерий, но и, в частности, для подробного изучения бактериальной репарации и репликации ДНК как ключа для понимания устойчивости патогенов человеческого организма.

*Исследование выполнено при финансовой поддержке Комитета науки Министерства образования и науки Республики Казахстан. (Грант № AP08856811).*

### Список литературы

- 1 Kong, X.P., Onrust, R., O'Donnell, M., & Kuriyan, J. (1992). Three-dimensional structure of the beta subunit of *E. coli* DNA polymerase III holoenzyme: a sliding DNA clamp. *Cell*, 69 (3); 425–437. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90445-i](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90445-i)
- 2 Goedken, E.R., Kazmirski, S.L., Bowman, G.D., O'Donnell, M., & Kuriyan, J. (2005). Mapping the interaction of DNA with the *Escherichia coli* DNA polymerase clamp loader complex. *Nature structural & molecular biology*, 12(2); 183–190. <https://doi.org/10.1038/nsmb889>

- 3 Moldovan, G.L., Pfander, B., & Jentsch, S. (2007). PCNA, the maestro of the replication fork. *Cell*, 129(4); 665–679. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.05.003>
- 4 Mizrahi, V., Henrie, R.N., Marlier, J.F., Johnson, K.A., & Benkovic, S. J. (1985). Rate-limiting steps in the DNA polymerase I reaction pathway. *Biochemistry*, 24(15); 4010–4018. <https://doi.org/10.1021/bi00336a031>
- 5 Hedglin, M., Kumar, R., & Benkovic, S.J. (2013). Replication clamps and clamp loaders. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 5(4); a010165. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a010165>
- 6 Dalrymple, B.P., Kongsuwan, K., Wijffels, G., Dixon, N.E., & Jennings, P.A. (2001). A universal protein-protein interaction motif in the eubacterial DNA replication and repair systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(20); 11627–11632. <https://doi.org/10.1073/pnas.191384398>
- 7 Johnson, R.E., Kovvali, G.K., Guzder, S.N., Amin, N.S., Holm, C., Habraken, Y., Sung, P., Prakash, L., & Prakash, S. (1996). Evidence for involvement of yeast proliferating cell nuclear antigen in DNA mismatch repair. *The Journal of biological chemistry*, 271 (45); 27987–27990. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.45.27987>
- 8 Clark, A.B., Valle, F., Drotschmann, K., Gary, R.K., & Kunkel, T.A. (2000). Functional interaction of proliferating cell nuclear antigen with MSH2-MSH6 and MSH2-MSH3 complexes. *The Journal of biological chemistry*, 275(47); 36498–36501. <https://doi.org/10.1074/jbc.C000513200>
- 9 Khanam, T., Rai, N., & Ramachandran, R. (2015). *Mycobacterium tuberculosis* class II apurinic/aprimidinic-endonuclease/3'-5' exonuclease III exhibits DNA regulated modes of interaction with the sliding DNA  $\beta$ -clamp. *Molecular microbiology*, 98(1); 46–68. <https://doi.org/10.1111/mmi.13102>
- 10 Patoli, A.A., Winter, J.A., & Bunting, K.A. (2013). The UmuC subunit of the E. coli DNA polymerase V shows a unique interaction with the  $\beta$ -clamp processivity factor. *BMC structural biology*, 13; 12. <https://doi.org/10.1186/1472-6807-13-12>
- 11 Pandey, P., Tarique, K.F., Mazumder, M., Rehman, S.A., Kumari, N., & Gourinath, S. (2016). Structural insight into  $\beta$ -Clamp and its interaction with DNA Ligase in *Helicobacter pylori*. *Scientific reports*, 6; 31181. <https://doi.org/10.1038/srep31181>
- 12 Kurz, M., Dalrymple, B., Wijffels, G., & Kongsuwan, K. (2004). Interaction of the sliding clamp beta-subunit and Hda, a DnaA-related protein. *Journal of bacteriology*, 186 (11); 3508–3515. <https://doi.org/10.1128/JB.186.11.3508-3515.2004>
- 13 Matsumiya, S., Ishino, Y., & Morikawa, K. (2001). Crystal structure of an archaeal DNA sliding clamp: proliferating cell nuclear antigen from *Pyrococcus furiosus*. *Protein science: a publication of the Protein Society*, 10(1); 17–23. <https://doi.org/10.1110/ps.36401>
- 14 De Biasio, A., & Blanco, F.J. (2013). Proliferating cell nuclear antigen structure and interactions: too many partners for one dancer? *Advances in protein chemistry and structural biology*, 91; 1–36. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-411637-5.00001-9>
- 15 Havens, C.G., & Walter, J.C. (2009). Docking of a specialized PIP Box onto chromatin-bound PCNA creates a degron for the ubiquitin ligase CRL4Cdt2. *Molecular cell*, 35 (1); 93–104. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.05.012>
- 16 Liang, Z., Diamond, M., Smith, J.A., Schnell, M., & Daniel, R. (2011). Proliferating cell nuclear antigen is required for loading of the SMCX/KMD5C histone demethylase onto chromatin. *Epigenetics & chromatin*, 4(1); 18. <https://doi.org/10.1186/1756-8935-4-18>
- 17 De Biasio, A., Campos-Olivas, R., Sánchez, R., López-Alonso, J.P., Pantoja-Uceda, D., Merino, N., Villate, M., Martín-García, J.M., Castillo, F., Luque, I., & Blanco, F.J. (2012). Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) interactions in solution studied by NMR. *PLoS one*, 7(11); e48390. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048390>
- 18 Gilljam, K.M., Feyzi, E., Aas, P.A., Sousa, M.M., Müller, R., Vågbø, C.B., Catterall, T.C., Liabakk, N.B., Slupphaug, G., Drablos, F., Krokan, H.E., & Otterlei, M. (2009). Identification of a novel, widespread, and functionally important PCNA-binding motif. *The Journal of cell biology*, 186 (5); 645–654. <https://doi.org/10.1083/jcb.200903138>
- 19 Müller, R., Misund, K., Holien, T., Bachke, S., Gilljam, K.M., Våtsveen, T.K., Rø, T.B., Bellacchio, E., Sundan, A., & Otterlei, M. (2013). Targeting proliferating cell nuclear antigen and its protein interactions induces apoptosis in multiple myeloma cells. *PLoS one*, 8(7); e70430. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070430>
- 20 Sebesta, M., Cooper, C., Ariza, A., Carnie, C.J., & Ahel, D. (2017). Structural insights into the function of ZRANB3 in replication stress response. *Nature communications*, 8; 15847. <https://doi.org/10.1038/ncomms15847>
- 21 Stodola, J.L., & Burgers, P.M. (2016). Resolving individual steps of Okazaki-fragment maturation at a millisecond time-scale. *Nature structural & molecular biology*, 23(5); 402–408. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3207>
- 22 Onrust, R., Stukenberg, P.T., & O'Donnell, M. (1991). Analysis of the ATPase subassembly which initiates processive DNA synthesis by DNA polymerase III holoenzyme. *The Journal of biological chemistry*, 266(32); 21681–21686.
- 23 Stukenberg, P.T., Studwell-Vaughan, P.S., & O'Donnell, M. (1991). Mechanism of the sliding beta-clamp of DNA polymerase III holoenzyme. *The Journal of biological chemistry*, 266(17); 11328–11334.
- 24 Neuwald, A.F., Aravind, L., Spouge, J.L., & Koonin, E.V. (1999). AAA+: A class of chaperone-like ATPases associated with the assembly, operation, and disassembly of protein complexes. *Genome research*, 9 (1); 27–43.
- 25 Erzberger, J.P., & Berger, J.M. (2006). Evolutionary relationships and structural mechanisms of AAA+ proteins. *Annual review of biophysics and biomolecular structure*, 35; 93–114. <https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.35.040405.101933>
- 26 Bowman, G.D., O'Donnell, M., & Kuriyan, J. (2004). Structural analysis of a eukaryotic sliding DNA clamp-clamp loader complex. *Nature*, 429 (6993); 724–730. <https://doi.org/10.1038/nature02585>
- 27 Simonetta, K.R., Kazmirski, S.L., Goedken, E.R., Cantor, A.J., Kelch, B.A., McNally, R., Seyedin, S.N., Makino, D.L., O'Donnell, M., & Kuriyan, J. (2009). The mechanism of ATP-dependent primer-template recognition by a clamp loader complex. *Cell*, 137(4); 659–671. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.03.044>

- 28 Jeruzalmi, D., O'Donnell, M., & Kuriyan, J. (2001). Crystal structure of the processivity clamp loader gamma (gamma) complex of *E. coli* DNA polymerase III. *Cell*, 106 (4); 429–441. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(01\)00463-9](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(01)00463-9)
- 29 Oyama, T., Ishino, Y., Cann, I.K., Ishino, S., & Morikawa, K. (2001). Atomic structure of the clamp loader small subunit from *Pyrococcus furiosus*. *Molecular cell*, 8 (2); 455–463. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(01\)00328-8](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(01)00328-8)
- 30 Seybert, A., Singleton, M.R., Cook, N., Hall, D.R., & Wigley, D.B. (2006). Communication between subunits within an archaeal clamp-loader complex. *The EMBO journal*, 25 (10); 2209–2218. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601093>
- 31 Guenther, B., Onrust, R., Sali, A., O'Donnell, M., & Kuriyan, J. (1997). Crystal structure of the delta' subunit of the clamp-loader complex of *E. coli* DNA polymerase III. *Cell*, 91 (3); 335–345. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80417-1](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80417-1)
- 32 Leu, F.P., Hingorani, M.M., Turner, J., & O'Donnell, M. (2000). The delta subunit of DNA polymerase III holoenzyme serves as a sliding clamp unloader in *Escherichia coli*. *The Journal of biological chemistry*, 275(44); 34609–34618. <https://doi.org/10.1074/jbc.M005495200>
- 33 Turner, J., Hingorani, M.M., Kelman, Z., & O'Donnell, M. (1999). The internal workings of a DNA polymerase clamp-loading machine. *The EMBO journal*, 18 (3); 771–783. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.3.771>
- 34 Stewart, J., Hingorani, M.M., Kelman, Z., & O'Donnell, M. (2001). Mechanism of beta clamp opening by the delta subunit of *Escherichia coli* DNA polymerase III holoenzyme. *The Journal of biological chemistry*, 276(22); 19182–19189. <https://doi.org/10.1074/jbc.M100592200>
- 35 Leu, F.P., & O'Donnell, M. (2001). Interplay of clamp loader subunits in opening the beta sliding clamp of *Escherichia coli* DNA polymerase III holoenzyme. *The Journal of biological chemistry*, 276 (50); 47185–47194. <https://doi.org/10.1074/jbc.M106780200>
- 36 Bunting, K.A., Roe, S.M., & Pearl, L.H. (2003). Structural basis for recruitment of translesion DNA polymerase Pol IV/DinB to the beta-clamp. *The EMBO journal*, 22 (21); 5883–5892. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg568>
- 37 Burnouf, D.Y., Olieric, V., Wagner, J., Fujii, S., Reinbolt, J., Fuchs, R.P., & Dumas, P. (2004). Structural and biochemical analysis of sliding clamp/ligand interactions suggest a competition between replicative and translesion DNA polymerases. *Journal of molecular biology*, 335 (5); 1187–1197. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2003.11.049>
- 38 Georgescu, R.E., Yurieva, O., Kim, S.S., Kuriyan, J., Kong, X.P., & O'Donnell, M. (2008). Structure of a small-molecule inhibitor of a DNA polymerase sliding clamp. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(32); 11116–11121. <https://doi.org/10.1073/pnas.0804754105>
- 39 Altieri, A.S., & Kelman, Z. (2018). DNA Sliding Clamps as Therapeutic Targets. *Frontiers in molecular biosciences*, 5; 87. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2018.00087>

Р.Б. Азнабаева, А.М. Тургимбаева, Ұ.Ө. Зейн, С.К. Абельденов

## Ақуыз-ақуыздың сырғымалы қысқыш әрекеттесуі үшін пептидтік тізбектер

Патогендік микроорганизмдердің антибиотиктерге төзімділігі бүгінгі күні бүкіл әлемде барған сайын қауіпті мәселеге айналуға, сонымен бірге жаңа антибактериалды нысандарды әзірлеу қажеттілігі артып келеді. Бактериялардан сырғымалы қысқыштар ашылған сәттен бастап көптеген зерттеулер жүргізді, олардың барысында оның ерекше қасиеттері ашылды — ДНҚ-мен байланысу, қалпына келтіру және репликация ақуыздарының белсенділігі мен тиімділігін арттыру мүмкіндігі, бұл бактериялардың ДНҚ зақымдалуына төзімділігін сақтаудағы үлкен рөлін көрсетеді. Қазіргі уақытта сырғымалы қысқыш функционалдық кешендер жасай алатын серіктес-ақуыздардың саны өсуде, сондықтан β-қысқыш жаңа антибиотиктерді іздеудің әлеуетті шешімі ретінде назар аударатын нысан болып табылады. Мақалада оның құрылымын жарықтандыру, құрылысын және әсер ету механизмін, сонымен қатар, оның барлық серіктес-белоктары үшін консервативті және ұқсас бірегей PIP β-қысқышты байланыстыру мотивін пайдалана отырып, көптеген серіктес-ақуыздарымен кешен құру қабілетін көрсететін кейбір зерттеулер ұсынылған.

*Кілт сөздер:* β-қысқыш, бактериялар, антибиотиктер, репарация, ақуыздар, төзімділік, ДНҚ, PIP-мотив.

R.B. Aznabayeva, A.M. Turgimbayeva, U.O. Zein, S.K. Abeldenov

## Peptide sequences for protein–protein sliding clamp interactions

Today antibiotic resistance to pathogenic microorganisms is becoming an increasingly dangerous problem all over the world. At the same time, the need for the development of new antibacterial targets is growing. Since the discovery of sliding clamps in bacteria, a large number of studies have been carried out during which its unique properties, such as the ability to bind to DNA and increase the activity and efficiency of repair and replication proteins, have been discovered, which underlines its important role in maintaining bacteria resistance to DNA damage. At the moment, the number of partner proteins with which the sliding clamp is

able to create functional complexes continues to grow, and therefore the  $\beta$ -clamp is the object of close attention of scientists as a potential solution for finding new antibiotics. This review article presents some studies highlighting its structure, structure and mechanism of functioning, as well as its ability to form complexes with many partner proteins using a unique *PIP*  $\beta$ -clamp binding motif, which is conservative and similar for all partner proteins.

*Keywords:*  $\beta$ -clamp, bacteria, antibiotics, repair, proteins, resistance, DNA, *PIP*-motif.