

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК  
СИБИРСКОЕ ОТДЕЛЕНИЕ  
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ  
ИНСТИТУТ ХИМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ И ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ

*на правах рукописи*

**Науменко Наталья Вильевна**

**Закономерности процесса удаления объемных аддуктов  
из кластерных повреждений ДНК системой NER млекопитающих**

1.5.4 – Биохимия

**ДИССЕРТАЦИЯ**

на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

**Научные руководители:**

**д.х.н., акад. РАН Лаврик Ольга Ивановна**

**к.х.н. Петрусева Ирина Олеговна**

Новосибирск – 2021

## ОГЛАВЛЕНИЕ

<b>ВВЕДЕНИЕ</b> .....	5
<b>Глава 1. Распознавание и эксцизия кластерных повреждений ДНК системой эксцизионной репарации нуклеотидов млекопитающих (обзор литературы).</b> .....	11
1.1. Введение.....	11
1.2. Система эксцизионной репарации нуклеотидов эукариот. ....	11
1.2.1. Субстратная специфичность системы NER. ....	11
1.2.2. Пути эксцизионной репарации нуклеотидов. ....	14
1.2.3. Инициация процесса NER. ....	15
1.2.4. Проверка наличия объемного повреждения (верификация) в ДНК.....	19
1.2.5. Сборка «предрасщепляющего» комплекса. ....	23
1.2.6. Репаративный синтез.....	25
1.3. Система эксцизионной репарации оснований эукариот.....	25
1.3.1. AP-сайты. ....	27
1.4. Кластерные повреждения ДНК. ....	28
1.4.1. Классификация кластерных повреждений ДНК.....	28
1.4.2. Оценка количества повреждений, возникающих в ДНК эукариотической клетки. Методы определения количества повреждений ДНК.....	29
1.4.3. Распределение повреждений в ДНК. ....	31
1.4.4. Факторы и условия, способствующие формированию кластерных повреждений ДНК.....	33
1.4.5. Эксцизия объемных повреждений ДНК из состава кластеров системой NER млекопитающих. ..	34
1.4.6. Метод постэксцизионного мечения для определения эффективности эксцизии повреждений ДНК системой NER. ....	39
1.5. Заключение.....	41
<b>Глава 2. Экспериментальная часть.</b> .....	42
2.1. Исходные материалы. ....	42
2.1.1. Используемые реагенты. ....	42
2.1.2. Синтетические олигодезоксирибонуклеотиды. ....	42
2.1.3. Буферные растворы, использованные в работе. ....	47
2.1.4. Оборудование. ....	48
2.2. Основные методы работы.....	49
2.2.1. Получение препаратов NER-компетентных экстрактов. ....	49
2.2.1.1. <i>Получение препарата NER-компетентного цельноклеточного экстракта</i> .....	49
2.2.1.2. <i>Получение препарата NER-компетентного экстракта из печени домашнего кролика <i>Oryctolagus cuniculus</i></i> .....	50
2.2.2. Электрофоретический анализ нуклеиновых кислот и белков. ....	50
2.2.2.1. <i>Электрофорез в неденатурирующих условиях</i> .....	50
2.2.2.2. <i>Электрофорез в денатурирующих условиях</i> .....	50

2.2.2.3. Электрофорез белков в денатурирующих условиях по Леммли [256].	51
2.2.2.4. Обработка гелей.	51
2.2.3. Получение протяженных модельных ДНК-дуплексов и фотоактивируемых ДНК-зондов.	51
2.2.3.1. 5'- Фосфорилирование олигодезоксирибонуклеотидов.	51
2.2.3.2. Достройка праймеров ДНК-полимеразой $\beta$ с использованием фотоактивируемых аналогов dNTP.	51
2.2.3.3. Выделение целевого олигодезоксирибонуклеотида.	52
2.2.3.4. Осаждение ДНК ацетоном в присутствии $LiClO_4$ .	52
2.2.3.5. Формирование модельных ДНК-дуплексов.	52
2.2.4. Методики экспериментов.	53
2.2.4.1. Определение угла изгиба ДНК-дуплекса, индуцированного присутствием повреждения.	53
2.2.4.2. Определение температуры плавления ДНК-дуплексов.	53
2.2.4.3. Исследование эффективности образования комплексов фактора XPC-RAD23B с ДНК методом торможения в геле.	53
2.2.4.4. Исследование эффективности образования комплексов белка XPD с ДНК методом торможения в геле.	54
2.2.4.5. Определение значений $EC_{50}$ для связывания белков репарации с модельными ДНК методом измерения анизотропии флуоресценции.	54
2.2.4.6. Фотоаффинная модификация белка XPC с использованием аналогов субстратов NER.	55
2.2.4.7. Фотоаффинная модификация белка XPD с использованием аналогов субстратов NER.	55
2.2.4.8. Определение эффективности расщепления AP-сайтов ферментом APE1.	55
2.2.4.9. Определение эффективности эксцизии модифицированного участка ДНК с использованием $\alpha$ - [ $^{32}P$ ]-dCTP.	56
2.2.4.10. Статистическая обработка полученных данных.	56
<b>Глава 3. Результаты и их обсуждение.</b>	<b>57</b>
3.1. Выбор модельных повреждений ДНК. Дизайн структур модельных ДНК-субстратов.	57
3.2. Исследование свойств ДНК, содержащих объемные повреждения в обеих цепях, как субстратов системы NER.	60
3.2.1. Оценка сродства фактора XPC-RAD23B к ДНК-дуплексам, содержащим объемные повреждения в обеих цепях.	60
3.2.2. Фотоаффинная модификация гетеродимера XPC-RAD23B с использованием зондов, имитирующих ДНК, содержащих кластерное повреждение.	63
3.2.3. Определение температуры плавления модельных ДНК.	65
3.2.4. Оценка эффективности эксцизии повреждения ДНК системой NER в присутствии в комплементарной цепи ДНК-дуплекса второго объемного повреждения.	67
3.3. Исследование свойств ДНК-дуплексов, содержащих объемную вставку и аналог AP-сайта в составе кластерного повреждения, как субстратов системы NER.	71
3.3.1. Оценка сродства фактора XPC-RAD23B к ДНК-дуплексам, содержащим объемную вставку и аналог AP-сайта в составе кластерного повреждения.	71
3.3.2. Определение величин изгиба оси ДНК-дуплексов, содержащих аналог AP-сайта (DEG) и объемное повреждение (nFlu).	74

3.3.3. Оценка эффективности инцизии AP-сайта, расположенного в составе кластерного повреждения ДНК с объемной вставкой nFlu, ферментом APE1.....	75
3.3.4. Определение эффективности эксцизии объемного повреждения ДНК системой NER при наличии в комплементарной цепи ДНК-дуплекса аналога AP-сайта.....	78
<b>3.4. Исследование взаимодействия комплекса субъединиц XPD-p44 фактора TFIIH с ДНК, несущими модельные повреждения. ....</b>	<b>86</b>
3.4.1. Сравнительная оценка эффективности эксцизии фотоактивируемых модельных повреждений ДНК системой NER.....	86
3.4.2. Определение величины изгиба оси ДНК-дуплекса, индуцированного модельным повреждением Fab(5)-dC.....	87
3.4.3. Оценка сродства геликазы XPD к ДНК, содержащим модифицированные нуклеотиды, несущие объемные группировки, методом торможения в геле.....	88
3.4.4. Исследование эффективности комплексообразования субъединиц XPD-p44 фактора TFIIH с ДНК методом флуоресцентного титрования.....	91
3.4.5. Исследование взаимодействия субъединиц XPD и p44 фактора TFIIH с ДНК, несущими фотоактивируемые модельные повреждения, методом фотоаффинной модификации.....	92
<b>Заключение.....</b>	<b>95</b>
<b>Выводы.....</b>	<b>97</b>
<b>Список сокращений и условных обозначений.....</b>	<b>98</b>
<b>Благодарности.....</b>	<b>101</b>
<b>Список литературы.....</b>	<b>102</b>
Приложение 1. Все ОДН, использованные в работе.....	126

## ВВЕДЕНИЕ

---

**Актуальность темы исследования.** Эксцизионная репарация нуклеотидов (англ. “nucleotide excision repair”, NER) является основным механизмом удаления объемных повреждений, существенно искажающих структуру ДНК-спирали. Повреждения, процессируемые NER, возникают в результате воздействия на ДНК живой клетки ультрафиолетового (УФ) и ионизирующего излучения, химиотерапевтических агентов, а также различных канцерогенов окружающей среды.

Система эксцизионной репарации нуклеотидов в клетках эукариот играет важную роль в поддержании стабильности генома [1,2]. Дефекты различных белков-участников процесса NER приводят к ряду тяжелых наследственных заболеваний: пигментной ксеродерме, синдрому Кокейна и светочувствительной форме трихотиодистрофии [3]. Накопление повреждений ДНК является одной из причин развития онкологических заболеваний и связано с преждевременным старением [2]. С другой стороны, высокая эффективность репарации аддуктов некоторых химиотерапевтических препаратов с ДНК в процессе NER может приводить к резистентности к ним раковых клеток [4,5].

Эффективность эксцизии повреждений ДНК системой NER может существенно различаться в зависимости от особенностей их структуры, а также от последовательности и локальной структуры ДНК вблизи повреждения, в том числе и от присутствия в окружающих участках ДНК дополнительных повреждений [6–8]. Два или более повреждений, расположенные в пределах одного-двух витков спирали ДНК, называют кластерными. Кластеры, состоящие из повреждений различной структуры, могут возникать в ДНК при интенсивном комбинированном воздействии повреждающих факторов: например, ионизирующего излучения и химиопрепаратов, а также при нарушении процессов репарации ДНК в клетке [9–15].

Особая токсичность кластерных повреждений для клетки связана, с одной стороны, с повышенной вероятностью возникновения в процессе их репарации двухцепочечных разрывов ДНК и, с другой стороны, со сложностью механизма репарации таких повреждений, что часто проявляется в их устойчивости к действию репаративных машин [16–18]. Торможение при репарации кластерных повреждений приводит к персистированию повреждений в клетке, что может вызывать остановку репликативной вилки и привести к образованию двухцепочечных разрывов (ДЦР) ДНК и ошибкам репликации [19,20]. Понимание структурных различий, которые превращают эффективно удаляемые повреждения в нерепарируемые, важно для создания новых методов профилактики и лечения онкологических заболеваний, а также для разработки более мощных химиотерапевтических препаратов, устойчивых к репарации.

Для повреждений, эффективно распознаваемых и репарируемых в процессе NER, характерна значительная степень искажения структуры ДНК-дуплекса в месте их введения. В тоже время эта система репарации не проявляет жесткой специфичности к структуре повреждений ДНК. Основой для необычайно широкой субстратной специфичности NER является способность этой системы репарации к узнаванию участков ДНК с искажениями регулярной структуры двойной спирали, вызванными присутствием объемных аддуктов нуклеотидных звеньев. Это обстоятельство позволяет использовать различные синтетические аналоги объемных повреждений (модельные повреждения) для изучения процесса NER.

В данной работе исследован процесс распознавания и удаления из ДНК объемных аддуктов, входящих в состав кластеров повреждений, белками системы NER. Созданы ДНК, содержащие кластерные повреждения различной архитектуры и состава. В состав одной серии кластеров входили звенья с объемными модификациями, эффективно распознаваемые системой NER в качестве изолированных повреждений – Fab(5)-dCMP, производное цитидина, несущее фотоактивируемую группировку; ненуклеотидные вставки nAnt и nFlu (фрагменты цепи ДНК, содержащие соответственно N-[6-(9-антраценкарбамоил)гексаноил]-3-амино-1,2-пропандиол и N-[6-(дипивалоил-5(6)-флуоресцеинилкарбамоил)гексаноил]-O1-(4,4'-диметокситритил)-O2-[(диизопропиламино)(2-цианоэтокси)фосфино]-3-амино-1,2-пропандиол). Другая серия ДНК была сконструирована и синтезирована с использованием вставки nFlu и аналога распространенного окислительного повреждения ДНК – апуринового/апиридинового (AP)-сайта, вставки на основе фосфодиэфира диэтиленгликоля – DEG (англ. “diethylene glycol”).

Проведен систематический анализ свойств созданных модельных ДНК, в том числе оценена эффективность протекания ключевых этапов NER – первичного узнавания поврежденного участка ДНК комплексом белков XPC (англ. “xeroderma pigmentosum type C”) и RAD23B, и эксцизии объемного повреждения ДНК белками системы NER *in vitro*. На основании экспериментальных данных были выбраны содержащие кластерные повреждения ДНК, эффективность эксцизии объемных повреждений из которых системой NER значительно различается. Благодаря данным компьютерного моделирования выявлены структурные особенности, характерные для устойчивых к репарации ДНК-дуплексов.

Следующая после первичного узнавания повреждения ДНК стадия процесса NER – его верификация – осуществляется мультисубъединичным фактором TFIIH. В данной работе исследовано взаимодействие комплекса субъединиц XPD (англ. “xeroderma pigmentosum type D”) и p44 фактора TFIIH, играющего ключевую роль в верификации повреждения, термофильного гриба *Chaetomium thermophilum* (Ct) с серией ДНК, содержащих модифицированные пиримидиновые нуклеотиды, несущие объемные фторазибензоильные или фторхлоразидопиридинильные группировки. Для ряда проанализированных модельных повреждений ДНК выявлена корреляция

между эффективностью их эксцизии из ДНК системой NER и эффективностью взаимодействия комплекса XPD-p44 фактора TFIIH с этими ДНК. Таким образом, эукариотический белковый комплекс XPD-p44 различает ДНК, содержащие репарируемые и нерепарируемые системой NER повреждения.

**Цели и задачи исследования.** Целью данной работы являлось исследование свойств ДНК, содержащих кластерные повреждения, как субстратов для системы NER, определение зависимости между типом и расположением повреждений ДНК в кластере и эффективностью их распознавания и последующей эксцизии в процессе NER, а также выявление структурных свойств, которые лежат в основе устойчивости повреждений ДНК к эксцизии, катализируемой системой NER.

В ходе работы планировалось решить следующие задачи:

1. Сравнить эффективность эксцизии модельных объемных повреждений ДНК в случае их расположения в составе группы повреждений, находящихся в противоположных цепях ДНК в пределах одного-двух витков спирали (двухцепочечного кластера), комплексом белков системы эксцизионной репарации нуклеотидов (NER), содержащимся в клеточных экстрактах.
2. Выявить особенности протекания этапа первичного узнавания объемных повреждений ДНК, расположенных в составе двухцепочечных кластеров: оценить сродство белкового комплекса XPC-RAD23B к модельным ДНК. Проанализировать структурные особенности модельных ДНК, содержащих объемное ненуклеотидное повреждение с флуоресцентильным остатком (nFlu) и вставку на основе фосфодиэфира диэтиленгликоля (аналог апуринового/апиримидинового (AP)-сайта) в составе двухцепочечного кластера, для которых характерна сниженная эффективность эксцизии nFlu системой NER.
3. Исследовать взаимодействия серии модельных ДНК, содержащих модифицированные пиримидиновые звенья, несущие объемные фотоактивируемые заместители, с рекомбинантными белками гриба *Chaetomium thermophilum* (*Ct*) – субъединицами XPD и p44 фактора TFIIH, осуществляющего верификацию повреждений ДНК, методами флуоресцентного титрования, торможения в геле и фотоаффинной модификации. Проанализировать влияние структуры объемных повреждений ДНК на эффективность протекания этапов их верификации и эксцизии, катализируемой NER.

**Научная новизна работы.**

В работе впервые проведено систематическое исследование того, как на эффективность первичного узнавания и эксцизии объемных повреждений ДНК системой общегеномной NER высших эукариот влияет присутствие в комплементарной цепи ДНК-дуплекса дополнительного

повреждения в пределах участка двухцепочечной (дц) ДНК, с которым взаимодействует белковый комплекс NER. Результаты, полученные в ходе исследования, позволяют выделить этап первичного узнавания поврежденной ДНК сенсорным комплексом XPC-RAD23B как определяющий резко сниженную эффективность эксцизии объемного повреждения ДНК из состава кластерного повреждения в процессе NER. При изучении взаимодействия субъединиц XPD и p44 фактора TFIIH на этапе верификации повреждения с ДНК впервые выявлена взаимосвязь между сродством XPD-p44 к поврежденной ДНК и эффективностью эксцизии повреждения. В сочетании с данными, полученными с применением метода фотоаффинной модификации, результаты экспериментов демонстрируют способность белкового комплекса XPD-p44 гриба *Chaetomium thermophilum* различать объемные повреждения ДНК.

**Теоретическая значимость работы** состоит в проведении систематического экспериментального исследования свойств модельных ДНК, содержащих кластерные повреждения, в состав которых входят объемные повреждения. Выявлены характерные для разных типов повреждений интервалы позиций противоположной цепи ДНК, появление в пределах которых дополнительных повреждений подавляет эксцизию, катализируемую системой NER. Показано, что наличие модельного объемного повреждения – вставки на основе nFlu – в различных положениях ДНК-дуплекса не оказывает значительного влияния на скорость расщепления AP-сайта апуриновой/апириимидиновой эндонуклеазой 1 (APE1), ключевым ферментом системы эксцизионной репарации оснований (англ. “base excision repair”, BER). Полученные данные согласуются с моделью [7,21], согласно которой AP-сайт и объемное повреждение, расположенные в составе кластера в комплементарных цепях ДНК-дуплекса, удаляются белками систем репарации BER и NER последовательно, что предположительно позволяет избежать превращения кластерного повреждения ДНК в ДЦР.

Результаты моделирования молекулярной динамики ДНК-дуплексов, содержащих кластерные повреждения, указывают на структурные причины наблюдаемого подавления эксцизии объемных повреждений системой NER. А именно, полное или частичное подавление эксцизии объемного повреждения, катализируемой системой NER, характерно для ДНК-дуплексов, в которых участок ДНК, непосредственно прилегающий к повреждению, оказывается локально стабилизированным за счет снижения подвижности звеньев ДНК.

**Практическая значимость работы.** Репарация ДНК является одной из актуальнейших тем исследований. Активность систем репарации ДНК в клетке значительно влияет на эффективность действия противоопухолевых препаратов. Понимание взаимосвязи между структурой повреждения ДНК и эффективностью его эксцизии системой NER необходимо для разработки новых терапевтических подходов к лечению онкологических заболеваний. На основании получен-

ных в настоящей работе данных предложена модель, объясняющая устойчивость объемного повреждения, расположенного напротив AP-сайта в ДНК-дуплексе, к репарации по механизму NER. Показано, что эффективность эксцизии повреждения ДНК может зависеть от эффективности прохождения стадии его верификации в процессе NER. Результаты систематического анализа свойств ДНК, содержащих кластерные повреждения, дополняют представления о механизме их репарации, их потенциальной биологической значимости и судьбе в клеточной ДНК.

**Основные положения, выносимые на защиту.**

1. При расположении модельного объемного повреждения ДНК в составе двухцепочечного кластера эффективность его эксцизии системой NER оказывается резко сниженной. Расстояние между повреждениями в молекуле ДНК, в пределах которого наблюдается подавление эксцизии, зависит от химической структуры повреждений, образующих двухцепочечный кластер.
2. Сенсорный фактор XPC-RAD23B проявляет повышенное сродство к ДНК, содержащим объемные повреждения в составе двухцепочечных кластеров.
3. Полное или частичное подавление эксцизии объемного ненуклеотидного повреждения nFlu, расположенного в составе двухцепочечного кластера с аналогом AP-сайта, может быть обусловлено повышением стабильности примыкающих к месту введения nFlu участков ДНК, а также наличием участков с высокой подвижностью цепей ДНК в удаленных от nFlu участках молекулы. Эти структурные особенности препятствуют формированию продуктивных комплексов белка XPC с ДНК и, в итоге, протеканию процесса NER.
4. Выявлены различия в эффективности взаимодействия рекомбинантных белков термофильного гриба *Chaetomium thermophilum* – XPD и p44, субъединиц фактора TFIIH, с ДНК, содержащими репарируемые и нерепарируемые системой NER модельные повреждения. Продемонстрировано, что в случае модельных ДНК, содержащих звенья цитидина с введенными в качестве заместителей объемными фотоактивируемыми группировками, эффективность взаимодействия комплекса XPD-p44 с повреждениями ДНК коррелирует с эффективностью их эксцизии системой NER.

**Апробация и публикация результатов.** По материалам диссертации опубликовано 4 научных статьи в рецензируемых журналах, индексируемых в базе Scopus. Результаты работы были представлены на Международной научной студенческой конференции (Новосибирск, Россия, 2015, 2016), VIII Всероссийском с международным участием молодых ученых биологов «Симбиоз – Россия» конгрессе (Новосибирск, Россия, 2015), Международной конференции, посвященной 90-летию академика Д.Г. Кнорре (Новосибирск, Россия, 2016), V съезде биохимиков России (Сочи–Дагомыс, Россия, 2016), Международной конференции 41nd FEBS Congress (он-

лайн форма проведения, 2016), Международном форуме 17th FEBS Young Scientist's Forum (Иерусалим, Израиль, 2017), Международной конференции 42nd FEBS Congress (Иерусалим, Израиль, 2017), Конференции молодых ученых биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов OpenBio (Кольцово, Россия, 2017), Международной Конференции EEMGS Annual Meeting (Потсдам, Германия, 2018), Всероссийская Конференция с Международным участием «Биотехнология-медицине будущего» (Новосибирск, Россия, 2019), VI съезде биохимиков России (Сочи–Дагомыс, Россия, 2019), BGRS/SB-2020 (Новосибирск, Россия, 2020), Международная конференция 45nd FEBS Virtual Congress (онлайн форма проведения, 2021).

**Личный вклад автора.** Получение и выделение модельных ДНК (49-, 54- и 137-звенных), очистка всех олигодезоксирибонуклеотидов (ОДН) после введения [ $^{32}\text{P}$ ] и очистка ОДН после автоматического синтеза, а также создание и характеристика ДНК-дуплексов проведены лично автором. Приготовление NER-компетентных экстрактов из клеток СНО (линия клеток яичника китайского хомячка, англ. “Chinese hamster ovary”), использованных в экспериментах, проведено лично автором либо совместно с к.х.н. Петрусевой И. О. Эксперименты по определению углов изгиба осей ДНК-дуплексов, индуцированных повреждениями, исследованию эффективности образования комплексов между белками репарации и ДНК, фотоаффинной модификации белков, определению эффективности катализируемого ферментом APE1 расщепления цепей ДНК-дуплексов, содержащих AP-сайт, и оценке эффективности эксцизии повреждений из протяженных модельных ДНК выполнены автором работы самостоятельно. Оценка устойчивости ДНК, содержащих остатки DEG, к действию нуклеаз экстракта клеток СНО проведено совместно с к.х.н. Петрусевой И. О. Эксперименты по дифференциальному плавлению ДНК-дуплексов были проведены совместно с к.ф.-м.н. Ломзовым А. А. Препарат рекомбинантного гетеродимера XPC-RAD23B был любезно предоставлен к.х.н. Петрусевой И. О. Рекомбинантные белки XPD и p44 гриба *Chaetomium thermophilum* были выделены и очищены к.х.н. Петрусевой И. О. и к.х.н. Анарбаевым Р. О. Препарат рекомбинантного фермента APE1 был любезно предоставлен д.х.н. Ходыревой С. Н.

Стратегия экспериментов разработана под руководством к.х.н. Петрусевой И. О. и д.х.н, акад. РАН. Лаврик О. И. Моделирование молекулярной динамики ДНК-дуплексов проведено к.ф.-м.н. Ломзовым А. А., рисунки 20-23, иллюстрирующие результаты компьютерного моделирования, также созданы Ломзовым А. А.

**Структура и объем диссертации.** Работа состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, результатов и их обсуждения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 127 страницах, содержит 29 рисунков, 13 таблиц и одно приложение. Библиография включает 297 литературных источников.

## **Глава 1. Распознавание и эксцизия кластерных повреждений ДНК системой эксцизионной репарации нуклеотидов млекопитающих (обзор литературы).**

---

### **1.1. Введение.**

В ходе жизнедеятельности эукариотической клетки в ДНК постоянно возникают повреждения. Они образуются как в процессе нормального клеточного метаболизма, так и под действием различных факторов окружающей среды. Системы репарации ДНК обеспечивают исправление этих повреждений. Репарация ДНК – это жизненно важный для клетки процесс, необходимый для поддержания стабильности генома [22,23].

Известны пять основных механизмов исправления повреждений ДНК в клетках эукариот: прямая репарация, «мисматч» репарация, рекомбинационная репарация, эксцизионная репарация оснований (BER) и эксцизионная репарация нуклеотидов (NER) [24,25]. Особенностью эксцизионных систем репарации ДНК является удаление фрагмента ДНК, содержащего повреждение, и последующая застройка бреши в процессе репаративного синтеза с использованием неповрежденной цепи как матрицы [22,26].

Кластерными называют множественные повреждения, расположенные в пределах одного-двух витков спирали ДНК [16]. Данный обзор литературы посвящен репарации кластеров, в состав которых входят удаляемые системой NER повреждения. Обзор содержит подробное описание механизма эксцизии повреждений системой NER. Также в обзоре проанализированы методы оценки количества повреждений, ежедневно возникающих в ДНК эукариотической клетки, и рассмотрены условия, способствующие формированию кластерных повреждений ДНК. Особое внимание уделено структурным причинам устойчивости повреждений в составе кластеров к эксцизии системой NER в клетках млекопитающих.

### **1.2. Система эксцизионной репарации нуклеотидов эукариот.**

#### **1.2.1. Субстратная специфичность системы NER.**

Эукариотическая система эксцизионной репарации нуклеотидов распознает и удаляет разнообразные по структуре объемные повреждения, которые, как правило, нарушают регулярную двухспиральную структуру молекулы ДНК [22,26]. Повреждения, процессируемые NER, возникают главным образом при воздействии на ДНК УФ-излучения и химически активных молекул [22]. К таким молекулам относятся как химиотерапевтические агенты [27,28], так и различные канцерогены окружающей среды: ароматические амины, метаболиты ПАУ (полициклических ароматических углеводородов) и токсины, продуцируемые растениями и грибами [29–32]. Есть данные, что система NER в клетках млекопитающих также участвует в элиминации окислительных повреждений [33,34], межцепочечных сшивок ДНК [35,36], сшивок ДНК-белок [37], AP-

сайтов некоторых типов [38]. Ниже приведена более подробная информация об основных типах повреждений ДНК, удаляемых системой NER, и о вызывающих их агентах.

**Повреждения ДНК, вызываемые УФ-излучением** Воздействие УФ-излучения, присутствующего в солнечном свете, способно вызывать повреждение клеточной ДНК, что делает его важнейшим канцерогенным фактором окружающей среды. Спектр УФ-излучения разделяют на УФ-А (315–400 нм), УФ-В (280–315 нм) и УФ-С (<280 нм) диапазоны [39]. УФ-В – это высокоактивный компонент солнечного излучения, который вызывает химические модификации ДНК и изменяет ее молекулярную структуру, формируя димеры. Основными типами фотоповреждений являются циклобутан-пиримидиновые димеры (CPD, англ. “cyclobutane pyrimidine dimers”) и пиримидин-(6,4)-пиримидиновые димеры (6-4PP, англ. “pyrimidine (6-4) pyrimidone photoproducts”), образующиеся преимущественно в результате ковалентного соединения, «сшивок» тимина и цитозина [22,40] (рис. 1).

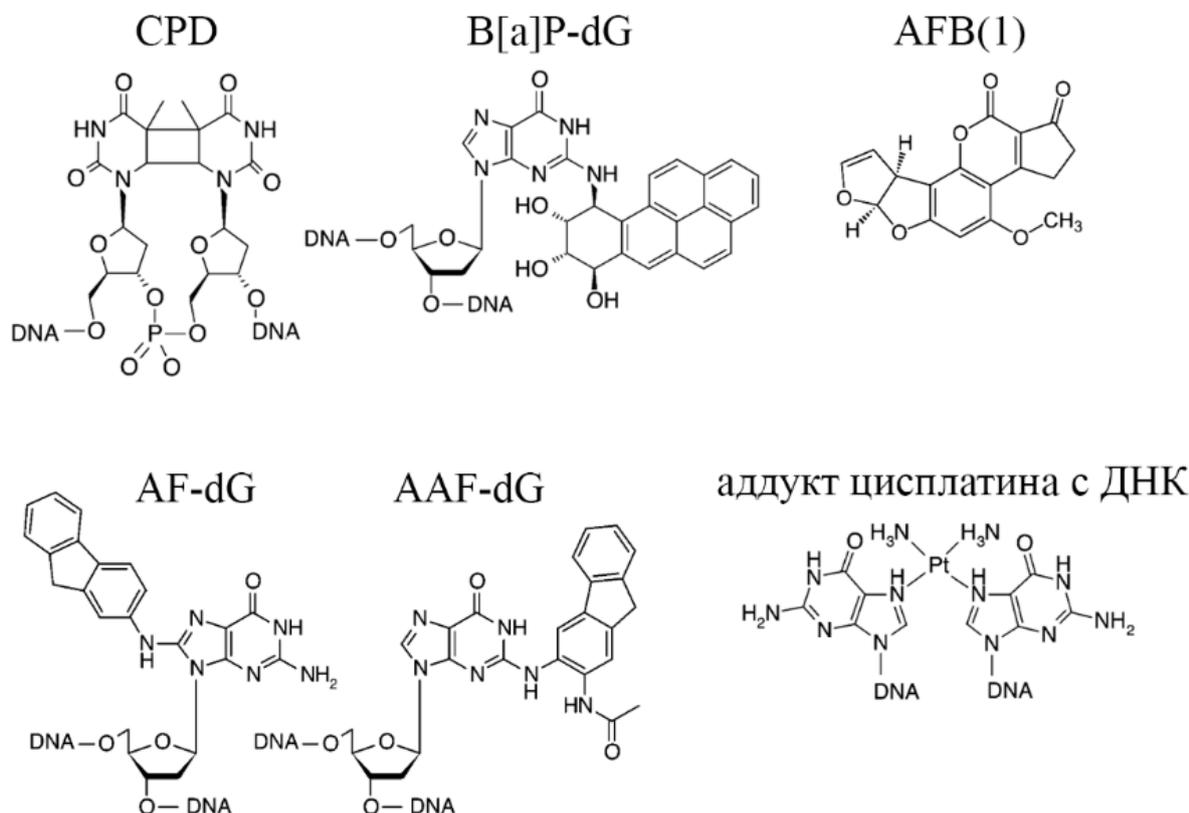


Рис. 1. CPD: циклобутан-пиримидиновый димер; B[a]P-dG: (+)-транс-бенз[а]пирен-модифицированный гуанозин; AFB(1): афлатоксин В1; AF-dG и AAF-dG: аминофлуореновый и ацетиламинофлуореновый ДНК-аддукты; аддукт цисплатина с ДНК: аддукт цис-диаминдихлорплатины с ДНК.

Согласно общепринятой точке зрения, в клетках человека повреждения ДНК, вызванные воздействием УФ-В излучения, репарируются исключительно по механизму NER [41,42]. Однако

результаты некоторых исследований указывают на возможность существования в клетках человека дополнительного механизма удаления таких повреждений, независимого от NER [43]. Воздействие солнечного УФ-А излучения на клетку приводит к генерации АФК (активных форм кислорода) и развитию окислительного стресса [44]. Солнечное УФ-С излучение количественно поглощается кислородом и озоном в земной атмосфере, поэтому не оказывает значительного эффекта на живые организмы [39].

**Химические канцерогены окружающей среды.** В основе биохимической адаптации животных к действию многих экзогенных соединений лежит метаболическая активация ксенобиотиков и последующее выведение их в виде метаболитов [45]. Одновременно, метаболическая активация экзогенных проканцерогенов ферментативными системами клетки с образованием реакционноспособных метаболитов является одной из основных причин генотоксичности множества химических соединений окружающей среды. Важнейшую роль в превращении объемных химических канцерогенов в их электрофильные метаболиты, реагирующие с ДНК, играют ферменты семейства цитохрома Р-450 [45,46].

**Полициклические ароматические углеводороды** – это соединения, образующиеся при неполном сгорании органических материалов. Многие ПАУ являются сильными мутагенами и канцерогенами: диметилбензантрацен, бензантрацен, дибензантрацен, бенз[а]пирен, хризен и другие соединения. Неметаболизированные ПАУ могут оказывать токсический эффект, однако главную опасность для клеточной ДНК представляют активные метаболиты некоторых ПАУ – например, бенз[а]пирен-диол-эпоксид [46]. Структура аддукта производного бенз[а]пирена с гуанозином (В[а]Р-dG) приведена на рис. 1.

**Гетероциклические ароматические амины и ароматические амины** – это структурно близкие классы канцерогенов, которые при метаболической активации образуют повреждающие ДНК метаболиты. Многие из этих соединений являются токсичными и потенциально канцерогенными (например, β-нафтиламин) [47]. Ароматические амины 2-аминофлуорен и N-ацетил-2-аминофлуорен первоначально были разработаны как пестициды, но так и не были использованы в этом качестве из-за их канцерогенных свойств [45]. Структуры аминофлуоренового и ацетиламинофлуоренового ДНК-аддуктов изображены на рис. 1. Различные производные аминофлуорена широко используются в качестве модельных повреждений для изучения системы NER [8,48].

**Афлатоксины** – это соединения, продуцируемые несколькими видами гриба *Aspergillus*, которые обитают в почве, разлагающейся растительности, сене и зернах [49,50]. Разные виды *Aspergillus* значительно различаются по способности продуцировать афлатоксины [49]. Основным источником афлатоксинов это грибы *A. flavus*, *A. parasiticus* и *A. nomius*, хотя они также продуцируются другими видами *Aspergillus*, а также *Emericella spp.* В природе существует, по меньшей

мере, двадцать различных афлатоксинов [51], причем четыре из них – афлатоксины В1, В2, G1 и G2 – особенно опасны для человека и животных, поскольку они были обнаружены во всех основных продовольственных сельскохозяйственных культурах. Структура наиболее токсичного из афлатоксинов – АFB(1), приведена на рис. 1. Аддукт, образующийся при реакции 8,9-экзо-эпоксид-АFB(1) с гуанином в ДНК. АFB(1)-N(7)-dG преимущественно репарируется системой NER [49].

**Антираковые препараты.** В основе цитотоксичности большей части антираковых препаратов, а также ряда антибиотиков и противовирусных препаратов лежит их способность нарушать структуру ДНК, в том числе в результате формирования ковалентных аддуктов с ДНК. Такие препараты как митомицин С и некоторые соединения платины (II) повреждают ДНК, образуя внутри- и межцепочечные сшивки. Цис-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] (цис-диамминдихлороплатина (II), цисплатин) широко используется для лечения множества типов рака, структура его аддукта с ДНК приведена на рис. 1. Попадая в клетку, цисплатин метаболизируется с образованием [Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl(OH<sub>2</sub>)]<sup>+</sup> и [Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(OH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup>, реакционноспособных соединений, взаимодействующих с многими компонентами клетки в первую очередь с ДНК. Платина молекулы цисплатина преимущественно образует ковалентные связи с позициями N7 пуринов (преимущественно, с гуанином [52]) с формированием 1,2- и 1,3-внутрицепочечных сшивок и меньшим количеством межцепочечных сшивок [53]. Было показано *in vitro* и *in vivo*, что внутрицепочечные аддукты цисплатин–ДНК удаляются системой NER [53,54].

### 1.2.2. Пути эксцизионной репарации нуклеотидов.

Эксцизионная репарация нуклеотидов является важнейшим механизмом репарации ДНК, удаляющим широкий спектр повреждений, искажающих структуру двойной спирали. В процессе NER участвуют более тридцати белков, последовательно формирующих комплексы на сайте повреждения ДНК [55]. Несмотря на сложность процесса эксцизионной репарации нуклеотидов, в настоящее время идентифицированы основные ферменты и белковые факторы, осуществляющие NER, и получены данные о механизме их действия [22,26].

Различают два пути NER: общегеномная репарация (GG-NER, англ. “global genome”) и репарация, сопряженная с транскрипцией (TC-NER, англ. “transcription-coupled”). Путь TC-NER, удаляющий повреждения, расположенные в транскрибируемой цепи активных генов, инициируется, когда повреждение в транскрибируемой цепи ДНК ограничивает активность РНК-полимеразы II [42,56]

В ходе процесса GG-NER распознаются и удаляются повреждения ДНК, расположенные во всем геноме, включая нетранскрибируемые участки и молчащий хроматин. Обнаружение по-

вреждений ДНК в пути GG-NER осуществляет специализированный белковый фактор XPC, сканирующий геномную ДНК в поисках участков термодинамической дестабилизации, индуцированных повреждением [55]. Схема процесса GG-NER приведена на рис. 2.

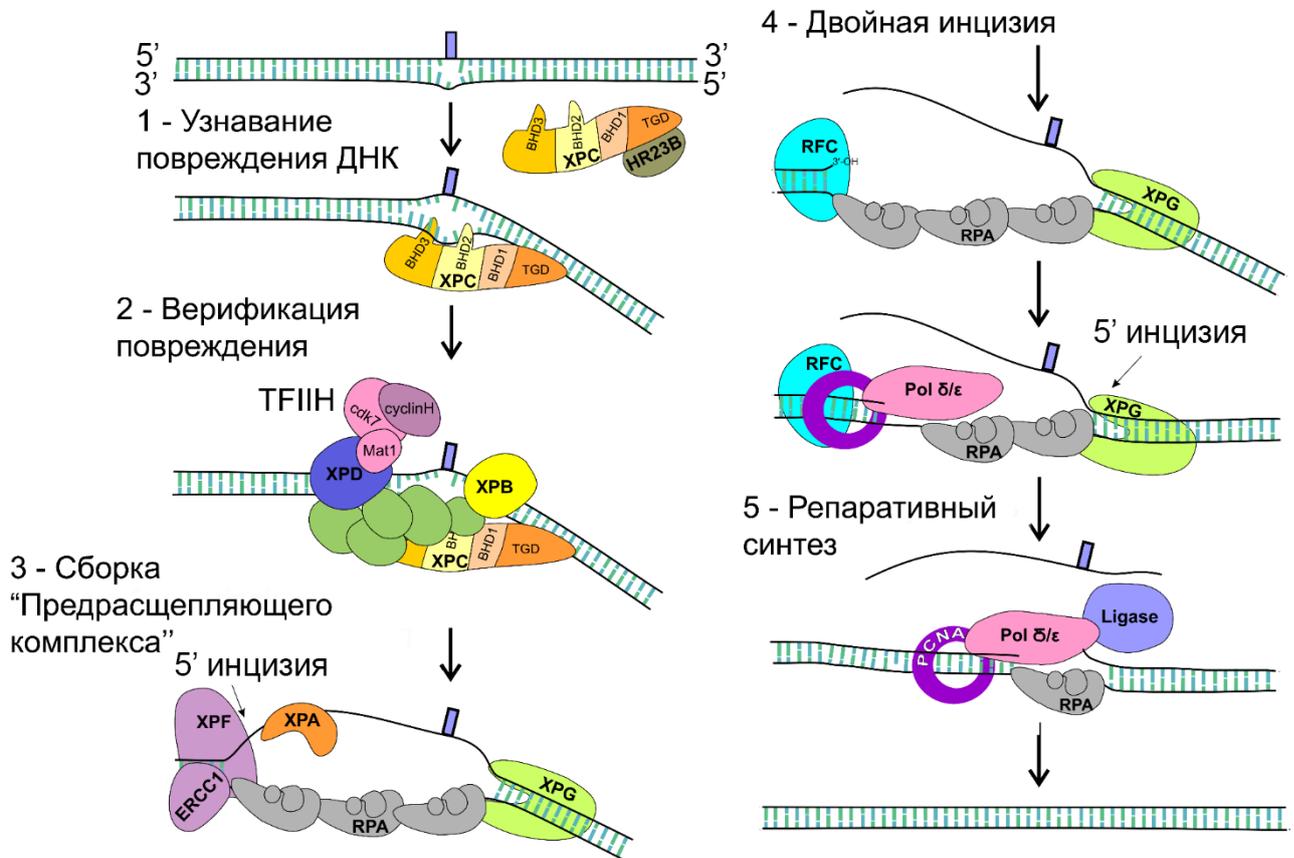


Рис. 2. Схема процесса общегеномной NER.

ТС- и GG-NER различаются механизмом инициации репарации, но после первичного распознавания повреждения оба процесса проходят по одинаковому молекулярному механизму, ключевыми моментами которого являются верификация повреждения ДНК субъединицами комплекса TFIIH и формирование комплекса белков, осуществляющего эксцизию содержащего повреждение фрагмента ДНК размером 24-32 нуклеотида. Затем происходит застройка образовавшейся брешы ДНК-полимеразами с участием сопутствующих факторов и последующим ферментативным лигированием ОЦР (одноцепочечных разрывов ДНК) [26].

### 1.2.3. Инициация процесса NER.

Распознавание повреждения ДНК – ключевая стадия, определяющая эффективность репарации [26]. Этот процесс разделяют на первичное распознавание повреждения ДНК и его верификацию. XPC является белком-сенсором, осуществляющим первичное распознавание по механизму GG-NER. Фактор XPC узнает и связывает участки ДНК с нарушенной регулярной структурой двойной спирали, находя поврежденные нуклеотиды на фоне огромного избытка неповрежденной ДНК [57–59].

В клетке фактор ХРС функционирует в виде комплексов (гетеродимерных и гетеротримерных) с белками RAD23В и CEN2 [22,60,61]. Было показано, что субъединица RAD23В при образовании комплекса с фактором ХРС стимулирует активность NER *in vitro* и *in vivo* [60,62], а также подавляет протеасомную деграцию белков, в том числе дрожжевого белка Rad4 (кодирующий его ген гомологичен гену, кодирующему белок ХРС), ингибируя их убиквитинилирование [63,64]. Взаимодействие фактора ХРС-RAD23В с CEN2, кальций-связывающим белком из семейства кальмодулина, повышает стабильность сенсорного комплекса. Функция субъединицы CEN2 в NER выяснена не до конца. Процесс NER *in vitro* может протекать без участия белка CEN2 – достаточно присутствия фактора ХРС-RAD23В [65,66].

Как предполагают некоторые исследователи, при поиске повреждений фактор ХРС-RAD23В перемещается вдоль молекулы ДНК скачкообразно, в режиме повторяющихся ассоциаций-диссоциаций с формированием множества короткоживущих комплексов, что позволяет сенсорному фактору «обходить препятствия» – белки, связанные с ДНК [67]. При встрече с участком ДНК, содержащим повреждение, фактор ХРС формирует стабильный комплекс с ДНК, к которому привлекаются последующие факторы NER [68,69]. При связывании белка ХРС с ДНК субъединица RAD23В диссоциирует из комплекса и, по всей видимости, не участвует в последующих стадиях NER [61]. Для эффективного узнавания фактором ХРС-RAD23В двух основных вызываемых УФ-излучением повреждений ДНК, CPD и 6-4PP, необходимо участие гетеродимера UV-DDB (англ. “UV-damaged DNA-binding protein”) [70–73]. Фактор UV-DDB проявляет повышенное сродство к некоторым повреждениям ДНК, особенно к 6-4PP [74,75]. В клетках фактор UV-DDB необходим для привлечения фактора ХРС-RAD23В к индуцируемым УФ-излучением повреждениям ДНК и их репарации. В отличие от белка ХРС, комплекс UV-DDB контактирует с повреждением ДНК напрямую через субъединицу DDB2 [71].

В работе [57] было проведено рентгеноструктурное исследование комплекса дрожжевого белка Rad4, и ДНК, содержащей повреждение CPD. В структуре белка ХРС/Rad4 были обнаружены две основные функциональные области: участок, состоящий из трансглутаминазного домена (TGD, англ. “transglutaminase-like domain”) и β-шпилечного домена (BHD1, англ. “beta-hairpin domain”), и участок, в который входят два β-шпилечных домена – BHD2/3 [57,76]. Уникальный механизм распознавания повреждения фактором ХРС/Rad4 лежит в основе широчайшей субстратной специфичности, проявляемой системой GG-NER. С помощью метода фотоаффинной модификации было показано, что факторы ХРС и Rad4 взаимодействуют с поврежденной ДНК по одинаковым позициям [77]. Белок ХРС/Rad4 не контактирует с самим повреждением, взаимодействуя лишь с двумя основаниями, окружающими повреждение, и двумя основаниями, расположенными напротив повреждения. Согласно двухстадийной модели узнавания повреждения [78], на первом этапе два β-шпилечных домена, BHD1/2, вместе с участком фактора ХРС «β-

витком» образуют минимальный сенсорный фрагмент, который распознает искажения регулярной двухцепочечной структуры ДНК и обеспечивает начальное – быстрое и неспецифичное – связывание фактора ХРС с ДНК. Формирование такого комплекса приводит к «выворачиванию» из спирали ДНК двух нуклеотидных пар, смежных с повреждением, с образованием «открытой структуры». Затем специфичный к повреждению ДНК-связывающий фрагмент белка ХРС, включающий в себя два  $\beta$ -шпилечных домена BHD2/3, связывает участок дц ДНК длиной 4 п.о. вблизи повреждения и охватывает неповрежденную цепь ДНК, сканируя ее одноцепочечный участок, индуцированный присутствием повреждения. Выступающая из домена BHD3  $\beta$ -шпилька внедряется в двухцепочечную спираль ДНК и вызывает изгиб ее остова на  $39-49^\circ$  [78,79] (рис. 3). Изгибание сахарофосфатного остова дц ДНК сопровождается формированием в месте перегиба ДНК-дуплекса участка с ослабленной двухцепочечной структурой [80].

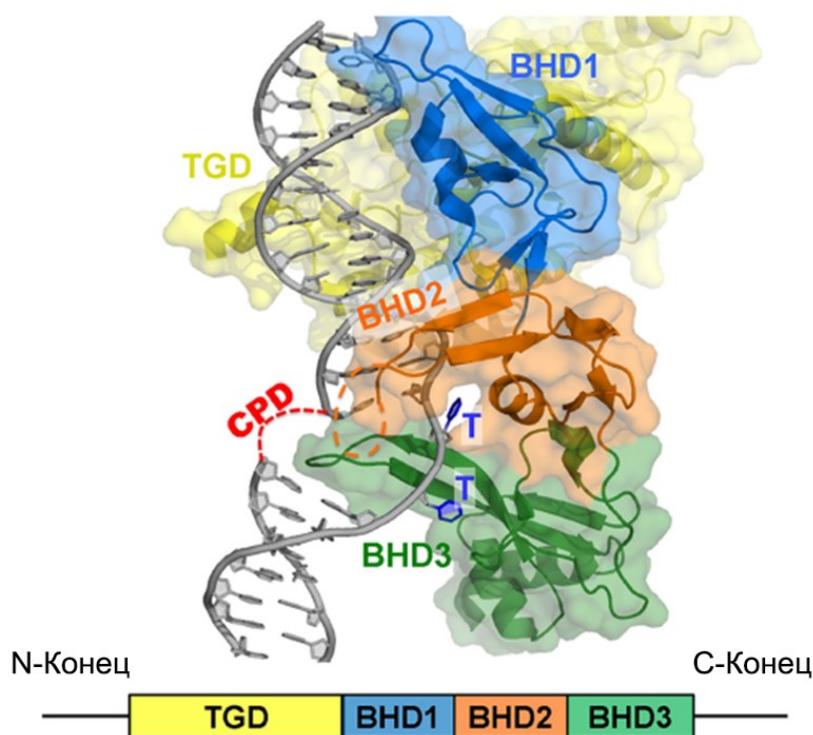


Рис. 3. Кристаллическая структура белка Rad4 (из [57,81]).

Дрожжевой белок Rad4, ген которого является ортологом гена ХРС человека, формирует продуктивный комплекс с ДНК, содержащей повреждение CPD. Повреждение ДНК CPD и домен BHD2 белка Rad4 обозначены на рисунке красной и оранжевой пунктирными линиями соответственно. Неспаренные тимины (Т), вывернутые из спирали, обозначены синим цветом. Транс-глутаминазный (TGD) домен фактора Rad4 обозначен желтым цветом, домен BHD1 – голубым; домен BHD2 – оранжевым; домен BHD3 – зеленым; молекула ДНК – серым цветом.

«Раскрытие» ДНК фактором ХРС может происходить и при отсутствии в этом участке повреждения. Таким образом, фактор ХРС может изначально связаться с неповрежденной ДНК, а затем «проверить» наличие повреждения с использованием доменов VHD2/3 [78].

Двухстадийную модель распознавания повреждений ДНК дополняет модель «кинетической конкуренции» (англ. “kinetic gating”), согласно которой селективность факторов ХРС при поиске повреждений является результатом действия механизма конкуренции между временем раскрытия ДНК и временем иммобилизации этого белка на каждом участке [68]. Скорость раскрытия ДНК фактором ХРС для поврежденной ДНК будет выше, чем для неповрежденной из-за ослабленных связей между азотистыми основаниями ДНК-дуплекса. С другой стороны, для успешного протекания этой и последующих стадий NER фактор ХРС должен образовать с поврежденными участками ДНК нуклеопротеиновые комплексы, которые характеризуются оптимальным по продолжительности временем жизни [8,68]. Показано, что слишком продолжительное время существования комплексов белка ХРС и ДНК препятствует протеканию процесса NER [8,82]. В случае если эти два параметра находятся в балансе, комплекс, который белок ХРС формирует с поврежденным участком ДНК, оказывается продуктивным [68].

Сочетание различных параметров взаимодействия фактора ХРС с ДНК – различная скорость раскрытия двойной спирали и сродство – является основой для невероятно широкой субстратной специфичности системы GG-NER [58,83].

Таким образом, фактор ХРС может взаимодействовать с поврежденной ДНК различными способами:

1). Продуктивное связывание, при котором фактор ХРС связывается с неповрежденной цепью, тем самым привлекая комплекс ТFIIN с 5'-стороны от повреждения в поврежденной цепи. Приводит к эксцизии поврежденного участка ДНК системой NER.

2). Непродуктивное связывание, при котором фактор ХРС связывается с поврежденной цепью ДНК и, как результат, комплекс ТFIIN оказывается с 3'-стороны от повреждения, в результате чего эксцизии повреждения из ДНК не происходит [59,84,85].

3). Непродуктивное связывание, вызванное затрудненной диссоциацией фактора ХРС от сайта повреждения ДНК, в результате чего его эксцизии в процессе NER не происходит [8].

4). Непродуктивное связывание, при котором стабилизация поврежденного участка ДНК затрудняет инсерцию β-шпильки VHD3 фактора ХРС в такую структуру, в результате чего продуктивный «открытый» комплекс белка ХРС с ДНК не образуется [7,86].

Первичное распознавание повреждения фактором ХРС является этапом, лимитирующим скорость процесса NER [68,87]. В клетке белок ХРС постоянно циркулирует из ядра в цитоплазму и обратно. Этот механизм позволяет поддерживать оптимальный уровень белка ХРС в ядре

клетки: его избыточное накопление может затруднять протекание различных процессов, связанных с обменом нуклеиновых кислот; кроме того, он позволяет импортировать фактор ХРС в клеточное ядро при массовом воздействии повреждающих агентов [88,89].

Несмотря на значительный прогресс, достигнутый в понимании механизма узнавания поврежденных участков ДНК белком-сенсором, до конца не выяснено, как белок ХРС находит повреждения ДНК в живой клетке на фоне миллионов пар оснований. Также представляет интерес дальнейшее изучение вопроса, как влияет тип повреждения и структура поврежденного участка, связываемого фактором ХРС, на эффективность протекания последующих стадий процесса NER [67,78,90].

#### 1.2.4. Проверка наличия объемного повреждения (верификация) в ДНК.

К сформированному на первой стадии репарации комплексу фактора ХРС с ДНК присоединяется фактор ТFIИИ, проявляющий к этому комплексу повышенное сродство [91,92]. ТFIИИ состоит из десяти субъединиц, семь из которых формируют коровый комплекс: XPB (от англ. “xeroderma pigmentosum type B”) и XPD (англ. “xeroderma pigmentosum type D”), проявляющие геликазную и АТР-азную активность, и p62, p52, p44, p34 и p8, не обладающие ферментативной активностью. Также в состав фактора ТFIИИ входит комплекс CDK-активирующей киназы (циклин-зависимой киназы, англ. “cyclin-dependent kinase”) САК, состоящий из субъединиц циклин Н, Cdk7 и МАТ1. Изображение структуры корового комплекса фактора ТFIИИ с ДНК представлено на рис. 4.

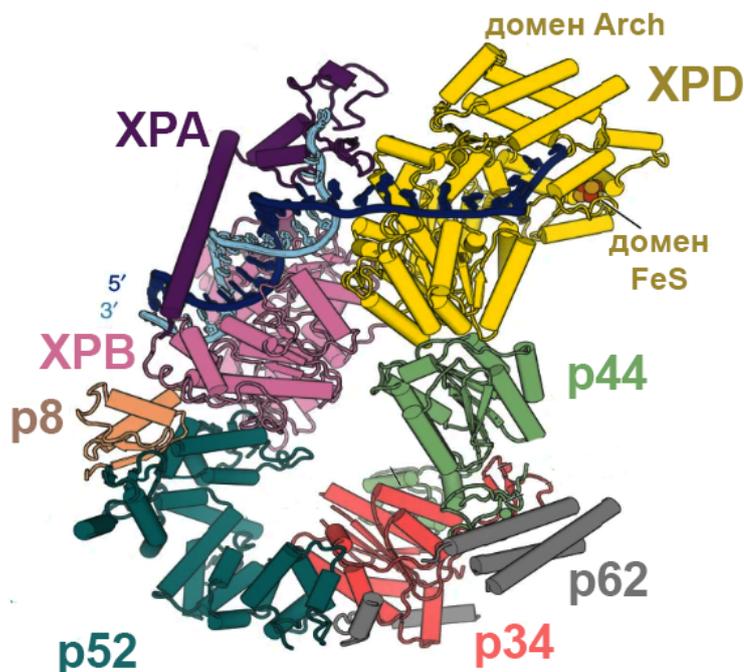


Рис. 4. Изображение структуры интермедиата NER, состоящего из корового комплекса фактора ТFIИИ, фактора ХРА и ДНК (на основе [93]).

С использованием электронно-микроскопического анализа была создана 3D модель фактора ТФИИ человека, согласно которой коровые белки фактора ТФИИ образуют кольцеобразную структуру, содержащую пору диаметром 2.6–3.4 нМ, через которую проходит двухцепочечная ДНК. Комплекс САК, образующий выступ на внешней стороне кольца, соединяется со структурой, образованной коровыми субъединицами, через взаимодействие с белком ХРД [94].

Помимо участия в репарации, фактор ТФИИ выполняет другую важную роль – он является транскрипционным фактором [95]. Функции его каталитически активных субъединиц ХРД и ХРВ в процессах транскрипции и репарации существенно различаются [96,97]: геликазная активность субъединицы ХРВ, в отличие от АТР-азной, по всей видимости, не является необходимой в процессе репарации [96,98], но играет важную роль в транскрипции. Геликазная активность субъединицы ХРД, напротив, необходима для процесса NER, но не в транскрипции [98,99]. В ходе транскрипции эта активность субъединицы ХРД подавляется через взаимодействие с САК-комплексом [99]. Недавно было показано, что фактор ХРА (от англ. “xeroderma pigmentosum complementation type A”) связывается с комплексом ТФИИ и «переключает» его функцию с транскрипционной на репарационную, катализируя высвобождение САК-комплекса [93,100]. В результате такой структурной перестройки субъединица ХРД получает возможность взаимодействовать с ДНК и осуществлять проверку наличия в ней повреждения.

Узнавание повреждения фактором ТФИИ происходит в две стадии. Сначала кольцеобразная структура фактора ТФИИ охватывает дц ДНК с 5'-стороны от повреждения, при этом комплекс САК, не участвующий в процессе NER, отделяется от фактора ТФИИ [95,101]. Присоединение фактора ТФИИ к интермедиату, образовавшемуся на стадии первичного узнавания повреждения ДНК, происходит через взаимодействие субъединиц ХРВ и р62 фактора ТФИИ с фактором ХРС [102,103]. Субъединица ХРВ оказывается связанной с ДНК с 3'-стороны от повреждения, что стимулирует ее АТР-азную активность [98,99]. Геликаза ХРВ внедряется между цепями дц ДНК, с помощью одного из доменов локально (примерно на 5 нуклеотидов) расплетая двухцепочечную ДНК в 3'→5' направлении [95]. Затем геликаза ХРД взаимодействует с поврежденной цепью ДНК с 5'-стороны от повреждения и расплетает ДНК также используя энергию АТР, но продвигаясь по поврежденной цепи в 5'→3' направлении, последовательно взаимодействуя при этом со всеми нуклеотидными звеньями этой цепи [98,104]. В результате разошедшиеся цепи ДНК формируют асимметричный участок длиной примерно 27 нуклеотидов (22 нт с 5'-стороны от повреждения и 5 нт – с 3'-стороны) [95] (рис. 2).

Субъединица ХРД фактора ТФИИ является ключевым «игроком» на стадии верификации повреждения ДНК и единственным (за исключением белка DDB2, участвующего в репарации повреждений ДНК, индуцированных УФ-излучением, 1.2.3) фактором NER, непосредственно взаимодействующим с повреждением ДНК. Белок ХРД принадлежит к семейству SF2B (от англ.

“Superfamily II B”) геликазы. Исследование кристаллической структуры белка XPD показало, что он состоит из четырех доменов: два геликазных RecA-подобных домена (HD1 и HD2, от англ. “helicase motor domain”), домен Arch и домен FeS, содержащий железосерный кластер [105–107]. HD1 и HD2 – это моторные домены геликазы XPD, раскручивающие двойную спираль ДНК с использованием энергии гидролиза АТФ. Через взаимодействие домена Arch белка XPD с MAT1, субъединицей комплекса CDK-активирующей киназы, происходит привлечение комплекса САК; мутации в домене Arch могут быть связаны со сниженной активностью NER и наличием такой болезни как трихотиодистрофия [99]. В недавнем исследовании [108] показано, что домен Arch белка XPD непосредственно участвует как в процессе разделения цепей ДНК, регулируя его геликазную активность; так и во взаимодействии факторов XPD и XPG (от англ. “xeroderma pigmentosum type G”).

Домен FeS геликазы XPD имеет ключевое значение для ферментативной функции этого белка: мутации в домене FeS также подавляют NER, но не влияют на транскрипционную активность фактора ТFIИИ [97]. Район С-конца белка XPD взаимодействует с коровой субъединицей фактора ТFIИИ – р44, которая стимулирует его геликазную активность [105–107]. Схематическое изображение геликазы XPD и субъединиц фактора ТFIИИ, с которыми она взаимодействует, приведено на рис. 5.

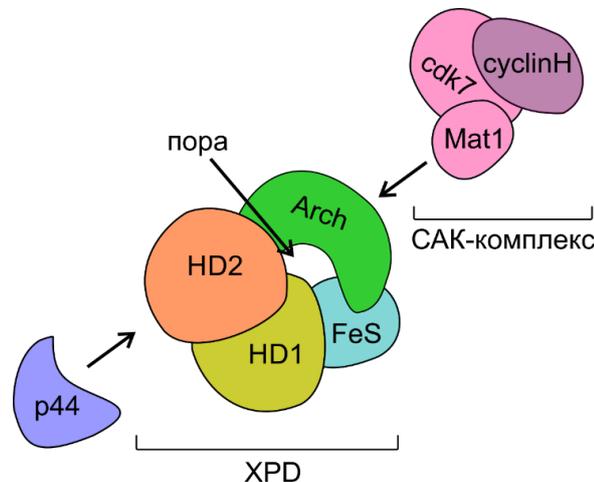


Рис. 5. Схематическое изображение геликазы XPD и белков комплекса ТFIИИ, с которыми она взаимодействует. Моторные домены белка XPD (HD1 и HD2) обозначены болотным и оранжевым цветами соответственно. Домен FeS белка XPD, содержащий железосерный кластер, имеет на схеме голубой цвет. Домен Arch белка XPD, через который происходит его взаимодействие с комплексом САК, обозначен зеленым цветом. Комплекс САК, взаимодействующий с белком XPD через субъединицу MAT1, обозначен на рисунке розовым цветом. Субъединица р44 фактора ТFIИИ, взаимодействующая с белком XPD через домен HD2, обозначена фиолетовым цветом.

На основании результатов биохимических и структурных исследований была предложена модель, описывающая взаимодействие белка XPD с поврежденной ДНК, согласно которой при верификации повреждения ДНК в клетках эукариот транслоцируемая (содержащая повреждение) цепь ДНК проходит через пору, образованную доменами Arch, FeS и HD2 белка XPD [97,106,108,109]. Диаметр поры достаточно велик для свободного продвижения геликазы по одноцепочечной ДНК даже при наличии в ней объемного повреждения [108]. Анализ кристаллических структур архейных аналогов белка XPD, а также изучение взаимодействия мутантных вариантов белка XPD человека с поврежденной ДНК позволили предположить, что окончательная верификация повреждения происходит при контакте «сенсорного кармана» XPD – особой структуры, последовательно взаимодействующей с каждым нуклеотидом поврежденной цепи ДНК. Вопрос о структуре сенсорного кармана и его точном расположении на поверхности глобулы требует проведения дополнительных исследований [97,109–111]. При контакте сенсорного кармана геликазы XPD с нуклеотидом, несущим объемное повреждение, ее продвижение по ДНК замедляется, при этом ее геликазная активность падает. В отличие от геликазной активности, АТР-азная активность иммобилизованного белка XPD возрастает [110]. Происходящая иммобилизация белка XPD маркирует повреждение, запуская формирование «предрасщепляющего» (англ. “preincision”) и эксцизионного комплексов NER. Таким образом, белок XPD может выполнять функцию молекулярного сенсора для проверки наличия в ее структуре повреждения.

Значительное продвижение в понимании структурной организации и механизма действия человеческой геликазы XPD было достигнуто благодаря данным, полученным при изучении ее ортологичных ей генов из архейных организмов *Thermoplasma acidophilum* и *Sulfolobus acidocaldarius* [97,105,106]. Архейные белки, кодируемые ортологами гена XPD, содержат все домены, необходимые для проявления геликазной активности, однако, в отличие от белка XPD человека, работают как мономеры, не входя в состав белкового комплекса, что ограничивает возможность их использования как функционального аналога человеческого белка XPD [112]. Геликаза XPD гриба *Chaetomium thermophilum*, как и XPD человека, функционирует в составе комплекса ТФИИ. Показано, что активность XPD *Ct*, также как и активность XPD человека, модулируется взаимодействием с субъединицей р44 фактора ТФИИ, которое осуществляется через N-концевой домен р44 [96,103,113].

В процессе верификации повреждения ДНК происходит окончательное подтверждение наличия повреждения на данном участке ДНК-дуплекса. Одновременно формируется более стабильная и протяженная структура, готовая к сборке «предрасщепляющего» комплекса, за которой последует формирование комплекса эксцизии и удаление из ДНК поврежденного участка (рис. 2).

### 1.2.5. Сборка «предрасщепляющего» комплекса.

Следующей стадией процесса NER является сборка комплекса, готового к эксцизии поврежденного участка, или «предрасщепляющего» комплекса. Входящие в состав этого комплекса факторы XPA, RPA (от англ. “replication protein A”) и XPG привлекаются к сайту повреждения ДНК независимо друг от друга [26]. Фактор XPA выполняет роль «платформы», с которой взаимодействуют другие белки NER и ДНК-субстрат [114,115]. На разных этапах процесса фактор XPA контактирует с белками факторов TFIIH (рис. 4), RPA, XPC, DDB2, ERCC1-XPF (от англ. “excision repair cross complementing-group 1” и “xeroderma pigmentosum type F”) и PCNA (от англ. “proliferating cell nuclear antigen”). Способность к осуществлению множественных специфических белок-белковых взаимодействий делает XPA важнейшим фактором системы NER. Также в ряде экспериментов *in vitro* было показано, что взаимодействие факторов XPA и RPA способствует более эффективному связыванию обоих белков с ДНК [22,116,117].

ДНК-связывающая активность фактора XPA характеризуется отсутствием выраженной селективности в отношении структуры повреждения, присутствующего в ДНК, но повышенным сродством к дцДНК с искаженной вторичной структурой, к примеру, с изломом структуры, индуцированным объемным повреждением [116–118]. При этом по сравнению с фактором XPC-RAD23B, сродство фактора XPA к поврежденным ДНК-дуплексам на порядки ниже [118]. В структуре этого белка выявлен минимальный ДНК-связывающий домен – XPA-MBD (от англ. “minimal DNA-binding domain of XPA”), содержащий Zn-связывающий мотив типа С4: четыре остатка цистеина координируют атом цинка [119]. Взаимодействия фактора XPA с белками производящего верификацию повреждений ДНК комплекса TFIIH важны для обеспечения селективности процесса NER [120].

Фактор RPA состоит из трех субъединиц: RPA70, RPA32 и RPA14. Гетеротримерный комплекс RPA участвует во множестве процессов, связанных с метаболизмом ДНК. В процессе NER присутствие фактора RPA необходимо для формирования «предрасщепляющего» комплекса NER и последующей эксцизии поврежденного участка ДНК [22]. В «предрасщепляющем» комплексе фактор RPA располагается в неповрежденной цепи ДНК, взаимодействуя с участком длиной примерно тридцать нуклеотидных звеньев, что соответствует размеру вырезаемого олигонуклеотида. Фактор RPA участвует в образовании «предрасщепляющего» комплекса, защищая ДНК от неспецифической нуклеазной деградации и обеспечивая точное расположение факторов XPG и ERCC1-XPF в репаративном комплексе [121]. Наибольшее сродство фактор RPA проявляет к неповрежденной одноцепочечной ДНК. Присутствие объемного повреждения, напротив, снижает его сродство к ДНК. ДНК-связывающие домены, расположенных в субъединицах RPA70 и RPA32 комплекса RPA, связываются с ДНК полярно: RPA70 связывается с 5'-областью одноцепочечного участка ДНК, а субъединица RPA32 – с 3'-областью [122–124].

Альтернативный вариант фактора RPA – aRPA, был обнаружен у приматов; эти белки обладают сходными биохимическими функциями, однако белок aRPA не участвует в процессе репликации ДНК. Предположительно, фактор aRPA функционирует на ранних стадиях процесса NER, а также способствует репаративному синтезу, осуществляемому ферментом ДНК-полимеразой  $\delta$  в присутствии факторов PCNA и RFC (от англ. “recombinant human replication factor C”) [125].

Структурно-специфическая эндонуклеаза XPG присоединяется к комплексу NER посредством взаимодействия с фактором TFIIH, замещая при этом фактор XPC и завершая формирование «предрасщепляющего» комплекса [81,126,127]. На этапе «предрасщепляющего комплекса» фактор XPG выполняет структурную роль – для завершения формирования «предрасщепляющего» комплекса проявление его каталитической активности не требуется [128].

### **1.2.6. Эксцизия фрагмента ДНК, содержащего повреждение.**

Факторы TFIIH, XPA, RPA и XPG образуют достаточно стабильный комплекс, присоединение к которому фактора ERCC1-XPF запускает реакцию двойной инцизии. Эндонуклеаза XPF формирует комплекс с белком ERCC1, который присоединяется к репаративному комплексу посредством взаимодействия субъединицы ERCC1 с фактором XPA и вносит разрыв в поврежденную цепь ДНК в 15–25 нуклеотидах (5') от повреждения [55,129]. При этом образуется свободная 3'-ОН группа, которую репликативная машина может использовать для инициации репаративного синтеза.

Структурные перестройки репаративного комплекса NER приводят к тому, что фактор XPG становится каталитически активным [130,131]. Фактор XPG вносит в ДНК разрыв в 3–9 нуклеотидах от повреждения (3'), в результате чего из дуплекса выщепляется поврежденный олигонуклеотид-продукт эксцизии длиной 24-32 нуклеотида. Таким образом, расщепление поврежденной цепи ДНК происходит ассиметрично относительно повреждения [92]. В результате внесения разрыва фактором XPG образуется 5'-фосфат, который необходим на стадии лигирования разрыва ДНК. К моменту, когда фактор XPG становится каталитически активным, примерно половина бреши оказывается заполнена путем репаративного синтеза. Такой механизм обеспечивает исчезновение бреши, образовавшейся в результате двойной инцизии [128].

Предположительно, олигонуклеотид, содержащий повреждение, выщепляется вместе со связанным с ним комплексом TFIIH, связывается с фактором RPA и, в конце концов, подвергается деградации [132,133]. Как предполагают некоторые исследователи, связывание олигонуклеотида-продукта эксцизии фактором RPA может играть роль в работе клеточного механизма, сигнализирующего о повреждениях ДНК [26,133].

### 1.2.6. Репаративный синтез.

Репаративный синтез и лигирование поврежденной цепи осуществляют ферменты, участвующие также при репликации ДНК: ДНК-полимеразы  $\delta$ ,  $\epsilon$  или  $\kappa$  и факторы RPA, PCNA и RFC [134] (рис. 2). Фактор PCNA, «скользящий зажим», представляет собой тримерный кольцеобразный белковый комплекс, который значительно увеличивает процессивность ДНК-полимераз. Комплекс RFC, пятисубъединичный белковый комплекс, катализирует реакцию загрузки фактора PCNA на ДНК. Фактор RFC связывается с 3'-ОН концом ДНК, расположенным с 5'-стороны относительно образовавшейся при эксцизии поврежденного фрагмента ДНК бреши [22].

Было установлено, что в репаративном синтезе также может участвовать ДНК-полимераза  $\kappa$ , способная к синтезу «через повреждение» (англ. “translesion polymerase”) [135,136]. Для привлечения в нуклеопротеиновый комплекс NER ДНК-полимеразам  $\delta$ ,  $\epsilon$  и  $\kappa$  требуются различные дополнительные факторы: для ДНК-полимераз  $\delta$  и  $\epsilon$  необходимы факторы RFC и PCNA, а вовлечение в комплекс ДНК-полимеразы  $\kappa$  происходит при участии белка XRCC1 (от англ. “X-ray repair cross-complementing protein 1”) и убиквитинированного фактора PCNA, как и в случае «синтеза через повреждение» [135,137].

Финальный этап репаративного синтеза – лигирование разрыва ДНК – может осуществляться как ДНК-лигазой I [138], так и ДНК-лигазой III $\alpha$  в комплексе с белком XRCC1 в зависимости от пролиферативного статуса клетки [139].

### 1.3. Система эксцизионной репарации оснований эукариот.

В данной работе были исследованы свойства ДНК, содержащих кластерные повреждения, в состав которых входит аналог AP-сайта. Основным путем удаления AP-сайтов в эукариотической клетке является процесс эксцизионной репарации оснований (англ. “base excision repair”, BER). Помимо AP-сайтов система BER удаляет из ДНК окисленные, алкилированные и дезаминированные азотистые основания, а также другие «необъемные» повреждения ДНК, вносящие незначительные искажения в структуру ДНК-дуплекса [140,141]. Далее приведено краткое описание механизма эксцизионной репарации оснований.

В системе BER, в отличие от NER, отсутствует универсальный сенсор повреждений ДНК. Процесс BER инициируется одной из одиннадцати обнаруженных у млекопитающих ДНК-гликозилаз, специфичных к повреждениям определенных типов [140]. ДНК-гликозилазы распознают поврежденные основания ДНК и катализируют расщепление N-гликозидной связи с формированием AP-сайта (рис. 6).

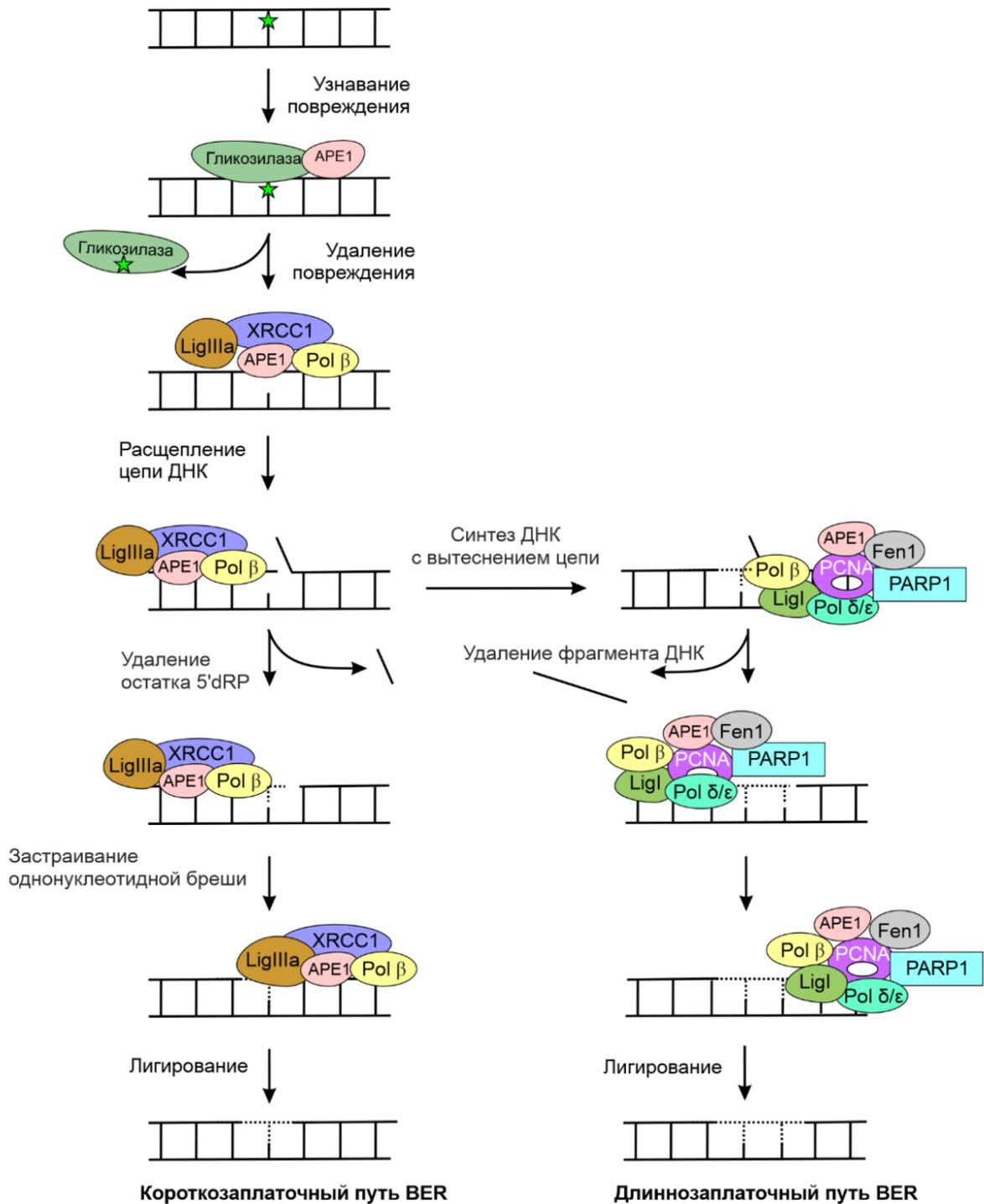


Рис. 6. Схема, иллюстрирующая процесс эксцизионной репарации оснований (на основе [142]).

В случае воздействия монофункциональной гликозилазы образовавшийся AP-сайт далее расщепляется ферментом апуриновой/апиримидиновой эндонуклеазой 1 (APE1). Этот многофункциональный белок является основным ферментом в клетке, инициирующим репарацию AP-сайтов по пути BER. Он обладает высокой инцизионной активностью в отношении этих повреждений, расщепляя цепь ДНК с 5'-стороны от них, в результате чего в поврежденной цепи ДНК образуется разрыв с 3'-гидроксильной группой и остатком 5'-дезоксирибозофосфата [143].

Бифункциональные ДНК-гликозилазы, которые удаляют в основном окисленные азотистые основания, катализируют разрыв N-гликозидной связи с образованием ковалентного интермедиата – основания Шиффа, с субстратом. [140,144]. При освобождении фермента из этого интермедиата в ДНК образуется ОЦР, который может затем обрабатываться ферментом APE1 [142,145].

После инициации процесс BER проходит по одному из двух путей: короткозаплаточному – с заменой одного нуклеотида, или длиннозаплаточному, с заменой 2-10 нуклеотидов (рис. 6) [142,146]. Большинство репарационных процессов протекает по короткозаплаточному пути, который может быть иницирован как моно-, так и бифункциональной гликозилазой [146]. В короткозаплаточном пути, в котором участвует монофункциональная гликозилаза, ДНК-полимераза  $\beta$  удаляет остаток 5'-дезоксирибозофосфата и застраивает одонуклеотидную брешь, подготавливая цепь ДНК к лигированию ДНК-лигазой I либо комплексом ДНК-лигазы III с белком XRCC1, выполняющим роль «платформы» (рис. 6) [142,146].

В длиннозаплаточном пути участвуют репликативные ДНК-полимеразы  $\delta$  или  $\epsilon$  (в некоторых случаях также полимеразы  $\beta$ ), вспомогательные репликативные факторы PCNA и RFC, эндонуклеаза FEN1 (от англ. “flap endonuclease 1”) и ДНК-лигаза I [146]. ДНК-полимераза при участии факторов PCNA и RFC осуществляет синтез ДНК с вытеснением цепи с образованием флэпа длиной 2-13 нуклеотидов. Затем эндонуклеаза FEN1 удаляет образующийся флэп, оставляя разрыв со смещением к 3'-концу относительно исходного положения повреждения ДНК. На заключительном этапе репарации ДНК лигируется ДНК-лигазой I [141,142].

### 1.3.1. AP-сайты.

AP-сайты – это группа высоко мутагенных и токсичных повреждений ДНК, возникающих при воздействии различных экзогенных и эндогенных факторов на ДНК. AP-сайты могут образовываться как при спонтанном отщеплении азотистых оснований от сахарофосфатного остова ДНК, так и в результате каталитического гидролиза N-гликозидной связи ДНК-гликозилазами в ходе процесса BER [147,148].

AP-сайты являются одними из самых частых видов повреждений ДНК. Их количество в ДНК значительно варьирует в зависимости от типа ткани, возраста организма и других факторов [149]. При физиологических условиях за день в клетке образуется около 10 тыс. апуриновых и около 500-1000 апиримидиновых сайтов [141].

Структуры природного AP-сайта в циклической и ациклической формах и его синтетических аналогов приведены на рис. 7. AP-сайты в ДНК млекопитающих репарируются преимущественно в процессе BER, распознаются и расщепляются ферментом APE1 [150]. Однако некоторые из химически гетерогенных AP-сайтов оказываются устойчивыми к действию эндонуклеазы APE1 и, следовательно, нерепарируемыми по механизму BER. Есть данные, что определенные

типы устойчивых к удалению системой BER AP-сайтов (например S-THF, рис. 7B) могут удаляться системой NER эукариот [38].

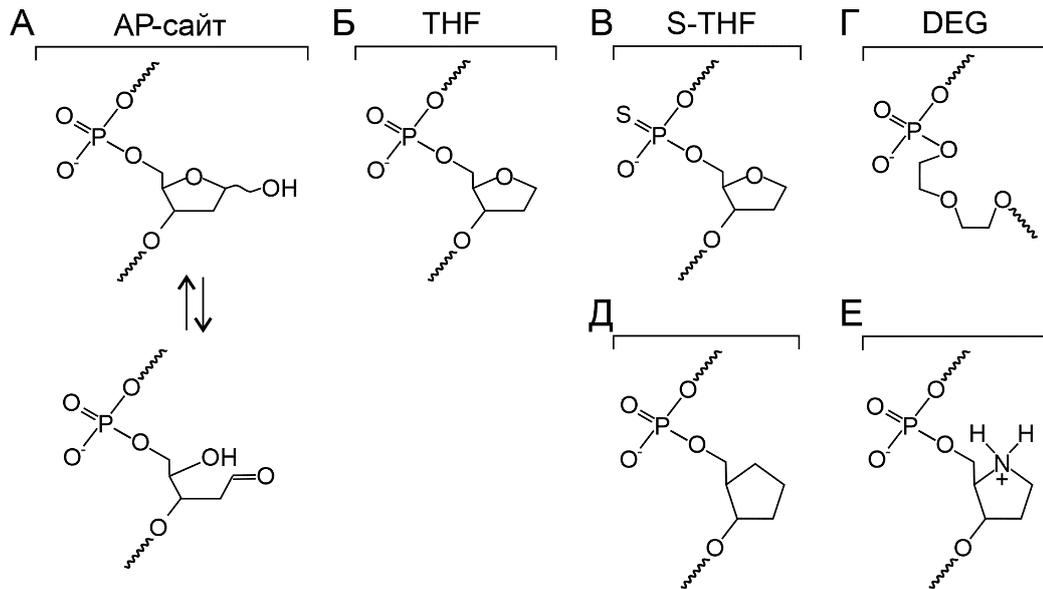


Рис. 7. Природный AP-сайт и его синтетические аналоги. (А). Природный AP-сайт в циклической и ациклической формах; (Б), (В). Остатки тетрагидрофурана (THF, англ. “tetrahydrofuran”); (Г). Вставка на основе фосфодиэфира диэтиленгликоля (DEG); (Д). Вставка на основе циклопентана; (Е). Вставка на основе пирролидина.

## 1.4. Кластерные повреждения ДНК.

### 1.4.1. Классификация кластерных повреждений ДНК.

Кластерные повреждения ДНК (называемые также сложными) определяют как близко расположенные множественные повреждения, находящиеся в пределах одного-двух витков спирали ДНК. В состав кластеров могут входить повреждения различных типов: ОЦР, ДЦР, модифицированные азотистые основания, AP-сайты, объемные повреждения [16,151,152].

Поскольку множественные повреждения ДНК является «нетипичным» субстратом для ферментов репарации, их удаление может быть затруднено [16–18,153]. Следовательно, факторы, генерирующие кластерные повреждения ДНК, оказывают более токсичные эффекты и потенциально более опасны для клеток млекопитающих [16,154–156]. Наибольшую опасность представляют кластеры, состоящие из повреждений, расположенных в обеих цепях ДНК. Согласно общепринятой точке зрения, при одновременной эксцизии повреждений в составе кластера, располагающихся в противоположных цепях ДНК-дуплекса, значительно повышается риск образования двухцепочечных разрывов ДНК, которые являются потенциально летальными для клетки [16,17,157–159]. Однако в работе [160] показано, что основная часть кластерных повреждений ДНК не конвертируются в ДЦР в клетках млекопитающих, что может указывать на существование механизмов, позволяющих избежать накопления опасных интермедиатов репарации. При

эксцизии повреждений ДНК, находящихся в составе кластеров, необходима точная регуляция работы систем репарации, обеспечивающая последовательный процессинг повреждений.

Предполагается, что подавление эксцизии поврежденных фрагментов ДНК при репарации кластерных повреждений, расположенных в обеих цепях дуплекса, позволяет избежать формирования ДЦР [18,158,161]. Однако повреждения ДНК, входящие в состав кластеров, которые избежали удаления и персистируют в клетке длительный период времени, могут блокировать процесс транскрипции и повышают вероятность остановки репликативной вилки, тем самым увеличивая риск образования ДЦР, ошибок репликации или более значительных нарушений структуры ДНК [162–164].

Чтобы оценить эффект, оказываемый кластерными повреждениями ДНК на жизнедеятельность эукариотической клетки, следует прояснить вопрос, насколько велика вероятность появления в ней таких структур. В следующих разделах будут приведены литературные данные по вероятностям образования одиночных повреждений в клеточной ДНК и методам определения их количества, распределению повреждений в ДНК, а также факторам и условиям, способствующим формированию кластерных повреждений ДНК.

#### **1.4.2. Оценка количества повреждений, возникающих в ДНК эукариотической клетки. Методы определения количества повреждений ДНК.**

Ежедневно в ДНК эукариотической клетки возникает от 1000 до 1 млн. повреждений ДНК, которые образуются как под воздействием различных химических и физических факторов, так и в ходе клеточного метаболизма [138]. В результате поврежденным оказывается лишь 0.00003–0.03% человеческого генома. Появление мутаций в критически важных участках ДНК клетки, к примеру, протоонкогенах и генах-супрессорах опухолей, способствует нестабильности генома и нарушениям различных клеточных процессов, и дает начало опухолевому процессу [23,165,166]. Генетические дефекты в системах репарации ДНК также повышают восприимчивость к различным типам рака [5,138,165]. Интенсивное воздействие повреждающих агентов в сочетании низкой эффективностью работы репаративных систем приводит к накоплению мутаций в клеточной ДНК, что способствует развитию онкологических заболеваний [29,167] и является одной из причин старения [168–170].

Для диагностики болезней, связанных с накоплением повреждений ДНК, а также для мониторинга изменений в клетках и тканях, происходящих при терапевтических воздействиях, необходимы методы, позволяющие детектировать различные типы повреждений ДНК. Количество экспериментальных исследований, посвященных выявлению возникающих в клетке повреждений ДНК и оценке их количества достаточно велико, однако их результаты часто расходятся (таблицы 1 и 2).

Таблица 1. Количество повреждений, образующихся в ДНК эукариотической клетки за день при нормальных физиологических условиях.

Тип повреждения	Количество повреждений ДНК
общее количество	~100 тыс. [148]
AP-сайты (включая интермедиаты процесса BER)	10 тыс.-55 тыс. [141,148,149]
апуриновые сайты	~10 тыс. [141]
апиридиновые сайты	~500-1 тыс. [141]
дезаминирование цитозина	100–500 [171]
одноцепочечные разрывы ДНК	10 тыс.-55 тыс. [148,165,172]
двухцепочечные разрывы ДНК	30-50 [173]
SAM (S-аденозил метионин, англ. “S-adenosyl methionine”)-индуцированное метилирование	~5 тыс. [174,175]
окислительные повреждения азотистых оснований	~10 тыс. [176]
8-оксо-2'-дезоксигуанозин	400–2 тыс. [141,177]
тимин-гликоль	до 2 тыс. [177]

Таблица 2. Количество повреждений, присутствующих в ДНК клеток человека.

Тип повреждения	Количество повреждений ДНК на клетку
количество аддуктов ДНК с производными ПАУ в клетках курящих людей	500–2 тыс. (в некоторых случаях до 6000) [178,179]
количество объемных повреждений ДНК, индуцированных воздействием интенсивного солнечного излучения, в кератиноцитах человека	до 100 тыс. [165]

Разброс результатов может быть обусловлен как некорректным выбором модельных систем, так и несовершенством методов оценки количества повреждений ДНК. В частности, Европейским комитетом по стандартизации в области окислительных повреждений ДНК (англ. “European standards committee on oxidative DNA damage”) была организована контрольная оценка базового уровня окислительных повреждений, существующего в клетках без воздействия генотоксических факторов. Эксперименты проводились в различных лабораториях с использованием одних и тех же биологических образцов лимфоцитов человека и клеток HeLa. Были использованы варианты комет-метода, оценивающие количество разрывов в ДНК и связывающие их количе-

ство с уровнем повреждений ДНК в целом, а также подход с применением ВЭЖХ (высокоэффективной жидкостной хроматографии), призванный выявить количество модифицированных оснований в ДНК [180]. При определении количества 8-оксо-2'-дезоксигуанозинов различия иногда были десятикратными [181].

Таким образом, вопрос разработки более производительных и воспроизводимых методов оценки количества повреждений актуален ввиду его важности как для фундаментальных, так и для эпидемиологических исследований [182–184]. Кроме того, новые подходы к определению количества повреждений ДНК в клетке нужны для оценки антиоксидантных свойств различных веществ и их способности защищать ДНК от повреждений [181,185]. Не менее важна оценка функционального состояния систем репарации ДНК, возможность специфического измерения уровня их активности в клетках и тканях, в том числе и при проведении химиотерапии [186–190].

### **1.4.3. Распределение повреждений в ДНК.**

Повреждения ДНК, а вслед за ними и мутации, распределяются по геному неравномерно, часто концентрируясь в определенных позициях, называемых «горячие точки мутагенеза». Расположение «горячих точек» отражает как внутренние свойства мутационного процесса, так и структурные и функциональные особенности контекста ДНК [191]. Преобладающий тип мутагена, действующего на организм, играет ключевую роль в распределении повреждений в ДНК. В результате множества мутационных процессов – ошибок репликации, воздействия экзогенных и эндогенных мутагенов, ферментативных модификаций ДНК, нарушенной репарации ДНК – формируется определенный паттерн соматических мутаций, называемый «мутационной подписью». По профилю мутационной подписи можно предположить, какие факторы вносят существенный вклад в процесс мутагенеза [192,193].

Для молекул генотоксических веществ характерно, в основном, неспецифическое связывание или связывание с низкой специфичностью к последовательности дц ДНК. Способы связывания малых молекул с ДНК определяются их структурой и включают интеркаляцию, внедрение в малую и большую бороздки, связывание с одноцепочечными участками ДНК, а также сочетание различных типов связывания [194,195]. В формировании межмолекулярных взаимодействий могут участвовать электростатические, гидрофобные, аллостерические, водородные связи и/или силы Ван-дер-Ваальса [195,196].

Значительную часть канцерогенов, образующих удаляемые системой NER аддукты, составляют электрофильные соединения, которые взаимодействуют с нуклеофильными атомами в составе ДНК. Наиболее реакционноспособными позициями являются (N7) гуанина и (N3) аденина, а также экзоциклические аминогруппы гуанина (N2) и аденина (N6) [22]. На реакционную способность атомов гуанина значительно влияет окружающая нуклеотидная последовательность

[22,197]. Молекула генотоксиканта может проявлять специфичность к определенной локальной структуре участка молекулы ДНК: например, бенз[а]пирен-7,8-диол-9,10-эпоксид предпочтительно реагирует с экзоциклической (N2) аминогруппой гуанина, расположенного в малой бороздке ДНК. Предполагается, что расположенные таким образом труднорепарируемые аддукты бенз[а]пирена наиболее часто встречаются в ДНК клеток млекопитающих [198]. AFB-8,9-эпоксид, активированный метаболит афлатоксина В, предпочтительно связывается с G:C богатыми регионами ДНК и формирует аддукт с (N7) гуанина [49,199]. Хорошо изученный канцерогенный ароматический амин, N-2-ацетаминофлуорен, образует аддукты по позиции (C8) гуанина [48,200]. Химиотерапевтический препарат цисплатин предпочтительно связывается с поли-dG (дезоксигуанозиновыми) участками ДНК [201].

Доступность конкретных позиций ДНК для воздействия повреждающего агента (например, в случае свободно-радикальной атаки) является важным фактором при образовании повреждений. Нарушение спаривания оснований при появлении объемного повреждения часто приводит к появлению в молекуле дц ДНК флуктуирующего «одноцепочечного» участка [32]. Появление объемного повреждения может вызывать значительное локальное искажение структуры ДНК-дуплекса и увеличение амплитуды динамических колебаний ДНК, что облегчает доступ окислительных агентов к ДНК. В результате на данном участке ДНК повышается риск спонтанного гидролиза гликозидных связей и образования вблизи объемного аддукта AP-сайта [202,203].

Белки хроматина играют роль важного защитного элемента молекулы ДНК от воздействия ионизирующего излучения, активных форм кислорода и генотоксических химических соединений [204–206]. Более низкая чувствительность ДНК, находящейся в гетерохроматине, к повреждающим агентам может быть связана не только с его структурой и степенью конденсации, но также с присутствием в гетерохроматине большего количества других белков по сравнению с участками деконденсированного хроматина. Помимо самого хроматина, в формировании защитного барьера от ионизирующего излучения вносят вклад различные хроматин-связывающие белки, ограничивающие доступ свободных радикалов к ДНК и реагирующие с этими радикалами [206,207].

Таким образом, на распределение повреждений в ДНК влияет множество факторов, включая молекулярный механизм связывания молекулы генотоксиканта с дц ДНК, особенности нуклеотидной последовательности и локальной структуры участка ДНК, а также степень компактизации хроматина. Таким образом, в определенных участках генома вероятность формирования кластерных повреждений оказывается повышенной.

#### 1.4.4. Факторы и условия, способствующие формированию кластерных повреждений ДНК.

Вероятность возникновения в ДНК кластерных повреждений различной структуры и состава возрастает при массовом воздействии на клетку повреждающих факторов: высоких доз радиоактивного и УФ-излучения, при проведении интенсивной химиотерапии и комплексной терапии, а также при воспалении [16,208,209]. Прием химиотерапевтических препаратов, многие из которых образуют с ДНК объемные аддукты на фоне окислительного стресса либо воспалительного процесса, сопровождающегося выделением NO (оксида азота(II)), индуцирует образование кластерных повреждений ДНК, в которые входят объемные и окислительные повреждения [210]. При воздействии даже низких доз радиоактивного излучения присутствие в ДНК платиновых аддуктов повышает вероятность возникновения кластерных повреждений ДНК в 1.5-2.5 раза [12,13].

Процесс воспаления может привести к избыточной продукции АФК и накоплению в клеточной ДНК окислительных повреждений. Например, при инфекции клеток эпителия желудка человека *Helicobacter pylori* в их ДНК накапливаются AP-сайты, что приводит к увеличению количества ДЦР. Предположительно, повышение уровня ДЦР возникает как результат репарации близко расположенных поврежденных азотистых оснований по механизму BER [14]. Хроническое воспаление может быть связано с бактериальными инфекциями, аутоиммунными заболеваниями, воспалительными заболеваниями кишечника, атеросклерозом, нейродегенеративными и метаболическими гормональными нарушениями [211,212]. Воспаление способствует процессу канцерогенеза, главным образом за счет вызываемого им окислительного стресса, возникновения мутаций и накопления повреждений ДНК [210]. Накопление окислительных повреждений азотистых оснований также характерно для тканей опухолей [15,213].

Воздействие определенных химических и физических агентов способствует формированию множественных повреждений ДНК. К таким воздействиям относится ионизирующее (ИИ) излучение. Повреждения ДНК индуцируются как прямой ионизацией (30–40% ИИ-индуцированных повреждений), так и в результате воздействия свободных радикалов, образующихся при радиолизе воды [214]. Кластерные повреждения ДНК индуцируются главным образом при радиолизе воды при воздействии X- и  $\gamma$ -излучения, которое индуцирует возникновения множества гидроксильных радикалов, способных взаимодействовать с биополимерами. Эндогенные процессы в клетке чаще приводят к генерации независимо расположенных одиночных АФК, в то время как воздействие ИИ-частицы может привести к образованию множественных АФК, локализованных в определенном участке клетки [215]. Установлено, что воздействие ионизирующего излучения ( $\gamma$ - и X-лучей) может приводить к образованию в ДНК двух или более AP-сайтов, а также азотистых оснований с окислительными повреждениями и двухцепочечных разрывов в пределах двух-

трех витков ее спирали [9,154]. Кластерные повреждения, состоящие из AP-сайтов и окисленных оснований, индуцированные ионизирующим излучением в изолированной ДНК, составляют около 80% от количества всех кластерных повреждений ДНК [216,217].

Препараты-радиомиметики, используемые для химиотерапии онкологических заболеваний, оказывают действие, аналогичное радиоактивному излучению. Они также могут способствовать появлению множественных повреждений ДНК, состоящих из одно- и двухцепочечных разрывов ДНК и AP-сайтов [218,219]. Например, препарат блеомицин – это гликопептид с выраженными цитотоксическими и мутагенными свойствами, вырабатываемый бактериями *Streptomyces verticillus*. Блеомицин сульфат взаимодействует преимущественно с дц ДНК, модифицируя азотистые основания в составе молекулы [218]. Одна часть молекулы блеомицин сульфата интеркалирует в ДНК, в то время как другая способна вступать в реакции с ионами металлов (Fe(II), восстановителем) и кислородом, и образовывать АФК, которые приводят к образованию кластерных повреждений, состоящих из ОЦР и AP-сайтов [218,220]. Блеомицин используется как химиопрепарат уже много десятилетий. Он является эффективным средством для лечения различных видов рака, однако существуют ограничения в его применении в связи с высоким уровнем его токсичности для организма [221,222].

#### **1.4.5. Эكсцизия объемных повреждений ДНК из состава кластеров системой NER млекопитающих.**

Последовательность ДНК, окружающая поврежденное звено, оказывает существенное влияние не только на вероятность образования повреждения на данном участке, но и на процесс эксцизионной репарации нуклеотидов. К примеру, эффективность эксцизии различных производных аминифлуорена в несколько раз изменяется в зависимости от последовательности ДНК, в которую они помещены [8,48]. Особый интерес в этой связи представляет исследование того, как происходит репарация кластерных повреждений ДНК. Использование в качестве инструментов синтетических ОДН, содержащих повреждения в определенных позициях, способствовало пониманию закономерностей репарации множественных повреждений ДНК.

В ряде исследований [7,86,223] было показано, что подавленная эксцизия повреждения ДНК системой NER может определяться на стадии первичного распознавания повреждения фактором ХРС-RAD23В в зависимости от структурных свойств поврежденного участка ДНК. Для эффективной работы системы NER важно наличие комплементарного основания напротив поврежденного нуклеотидного звена. Например, эксцизия из ДНК различных стереоизомеров аддукта В[а]Р-dG белками системы NER происходит с различной, но достаточно высокой эффективностью в тех случаях, когда они представляют собой одиночные повреждения ДНК, напротив которых в комплементарной цепи находится цитозин [6].

При замене комплементарного dC (дезоксцитидин) на dA (дезоксиаденозин) эффективность эксцизии (+)-*транс*-B[a]P-dG была умеренно (примерно на 30%) снижена; при отсутствии комплементарного нуклеотидного звена, dC, эксцизия этого повреждения была снижена значительно – примерно в 10 раз. Эффективность эксцизии других изомеров B[a]P, (+)-*цис*-B[a]P-dG и (-)-*цис*-B[a]P-dG, была практически полностью подавлена и в случае замены комплементарного dC на dA, и при отсутствии комплементарного dC [6]. Схематическое представление проанализированной в этих исследованиях модельной ДНК показано на рис. 8А,Б.



Рис. 8. Проанализированные в различных исследованиях модельные ДНК, содержащие кластерные повреждения. (А). ДНК, содержащие аддукт B[a]P-dG и однонуклеотидную замену или делецию в противоположной позиции дуплекса [6]. (Б). ДНК, содержащие аддукт B[a]P-dG и аналог AP-сайта напротив него [7]. (В). ДНК, содержащие CPD и аналог AP-сайта в одной цепи или CPD и выпетливание в комплементарной цепи [224]. (Г). ДНК, содержащие моно- или ди-аддукт FААF-dG (флюориновое производное N-(2'-дезоксигуанозин-8-ила)-2-ацетиламинофлуорена) [8].

Изучение репарации модельных ДНК, содержащих аналог AP-сайта (THF, рис. 7Б) напротив *цис*- или *транс*-стереоизомера производного бенз[а]пирена (B[a]P-dG) в составе кластерного повреждения (рис. 8А), показало, что активность системы NER полностью подавляется при замене канонического основания dC, расположенного напротив B[a]P-dG аддукта, на AP-сайт. При этом система BER сохраняет способность к осуществлению репарации AP-сайта, расположенного в такой структуре. Эффективность расщепления цепи ДНК, содержащей AP-сайт, ферментом АРЕ1 варьирует в зависимости от конформации объемного повреждения в комплементарной цепи ДНК-дуплекса и от взаимного расположения повреждений [203,225].

Понимание причин устойчивости ДНК-дуплексов, содержащих напротив аддукта производного бенз[а]пирена делецию вместо комплементарного звена dC, к репарации системой NER было достигнуто в результате проведения экспериментов по измерению термической стабильности ДНК-дуплексов, структурных ЯМР-исследований, а также с применением методов компьютерного моделирования [223,226]. Присутствие аддукта (+)-*цис*-B[a]P в ДНК вызывает локальную дестабилизацию ДНК-дуплекса, при этом комплементарное звено dC находится в «вывернутом» положении. При распознавании такого повреждения фактор ХРС легко внедряет β-шпильку домена VHD3 в ДНК-дуплекс и без затруднений взаимодействует с вывернутым цитозинным основанием, в результате чего образуется продуктивный комплекс фактора ХРС с ДНК. Такое распределение участков дестабилизации в ДНК-дуплексе обеспечивает эффективную эксцизию (+)-*цис*-B[a]P из ДНК.

При отсутствии напротив аддукта бенз[а]пиренового производного в ДНК комплементарного звена dC (т.е., в случае делеции) происходит значительное усиление стэкинг-взаимодействий между ароматическим кольцом B[a]P и окружающими азотистыми основаниями, что стабилизирует поврежденный участок ДНК [86,227]. Инсерция β-шпильки VHD3 фактора ХРС в такую структуру будет затруднена, следовательно, продуктивный «открытый» комплекс фактора ХРС с ДНК не будет образовываться (подробное описание механизма распознавания поврежденного участка ДНК фактором ХРС-RAD23B приведено в разделе 1.2.3). Кроме того, делеция нуклеотидного звена напротив повреждения ДНК соответствует потере одного из оснований, с которыми при распознавании повреждения контактируют ароматические аминокислоты из домена VHD2/3 белка ХРС [55,57]. В результате эксцизия аддукта B[a]P-dG, находящегося в составе двухцепочечного кластерного повреждения ДНК, системой NER оказывается подавленной. Аналогичный «эффект отсутствующего основания» также может относиться к другим нерепарируемым в процессе NER структурам [7,86].

Следует отметить, что наличие азотистого основания в позиции комплементарной цепи ДНК, расположенной напротив объемного повреждения, не является абсолютно необходимым условием для активности NER, а степень ее подавления зависит от структуры повреждения [86]. Примером такого аддукта является пищевой мутаген 2-амино-1-метил-6-фенилимидазо[4,5-В]пиридин, в составе которого есть подвижное фенильное кольцо, разрушающее водородные связи в окружающих участках ДНК и приводящее к существенной дестабилизации их структуры [86].

Количество исследований по репарации кластерных повреждений ДНК, расположенных в одной цепи ДНК, системой NER сравнительно невелико. В исследовании [8] было показано, что моно- и диаддукты производного аминифлуорена удаляются белками NER с близкой эффективностью (схемы проанализированных модельных ДНК приведены на рис. 8Г).

Кроме того, в работе [228] получены данные, указывающие на возможность системы NER репарировать окисленные азотистые основания в составе кластерного повреждения, расположенные в одной цепи ДНК.

В работе [224] показано, что появление аналога AP-сайта, сдвинутого относительно повреждения CPD в направлении 5'-конца поврежденной цепи ДНК, значительно стимулировало эксцизию CPD-содержащего фрагмента системой NER. Появление в структуре ДНК-дуплекса выпетливания с 5'-стороны относительно CPD, также многократно повышало эффективность его эксцизии (модельные ДНК схематически изображены на рис. 8В). Авторы данной работы предположили, что появление неспаренного участка в структуре ДНК-дуплекса «ослабляет» и дестабилизирует его структуру, что способствует более эффективному распознаванию повреждения фактором XPC-RAD23B. Фактор TFIIH, осуществляющий верификацию повреждений ДНК в процессе NER, после связывания со специфическим комплексом XPC-ДНК транслоцируется по ДНК в 5'→3'-направлении в поисках повреждения. Следовательно, связывание белка XPC в области дестабилизации ДНК, расположенной с 5'-стороны от объемного повреждения, способствует эффективной эксцизии этого повреждения [84,90].

В ряде работ показано, что фактор XPC-RAD23B проявляет повышенное сродство к участкам ДНК, содержащим кластерные повреждения [8,203]. Повышенное сродство фактора XPC-RAD23B к ДНК не всегда ассоциировано с высокой эффективностью эксцизии повреждений системой NER, что ранее было продемонстрировано как для изолированных [90,229], так и для кластерных повреждений ДНК [7]. Наличие корреляции между эффективностью репарации повреждений ДНК в процессе NER и эффективностью их распознавания фактором XPC-RAD23B описано для ряда ацетиламинофлуореновых аддуктов [87]. С другой стороны, было обнаружено, что несмотря на небольшие различия в сродстве комплекса XPC-RAD23B к ДНК-дуплексам, содержащим производные бенз[а]пирена, эффективность репарации этих повреждений значительно различается [8,230]. Также было показано, что фактор XPC-RAD23B обладает близким сродством к объемным модельным повреждениям ДНК, nAnt (ненуклеотидная вставка с объемным антрацетилкарбамоильным заместителем) и Far-dC (цитозин с фторхлоразидопиридильной группировкой), при этом Far-dC является нерепарируемым повреждением, а nAnt эффективно удаляется белками системы NER [90].

Эффективность первичного узнавания повреждения зависит от расположения участков дестабилизации ДНК в поврежденном участке. Фактор XPC-RAD23B может формировать с ДНК как продуктивные, так и непродуктивные комплексы (подробнее в разделе 1.2.3), что зависит от присутствия искажений в структуре ДНК-спирали [77] и от структурных и стереохимических свойств самого объемного повреждения [116,230]. Снижение формирования продуктивных комплексов фактора XPC с ДНК, и, как следствие, подавление эксцизионной активности NER может

быть обусловлено как стерическими затруднениями для связывания белка ХРС с ДНК [7,86], так и его замедленной диссоциацией от сайта повреждения [8].

Особенный интерес представляет изучение взаимодействий между белками различных систем репарации, которые могут иметь место при удалении кластерных повреждений ДНК. Данные по такой кооперации достаточно ограничены. В работе [203] было проанализировано влияние фактора ХРС-RAD23В на способность эндонуклеазы АРЕ1 к гидролизу АР-сайта при наличии в различных позициях комплементарной цепи ДНК объемного повреждения, В[а]Р-dG. Присутствие фактора ХРС-RAD23В стимулировало эндонуклеазную и ингибировало 3'-5'-экзонуклеазную активность АРЕ1. Также в работе [231] было показано, что фактор ХРС-RAD23В стимулирует активность фермента тимин-ДНК-гликозилазы, участника процесса BER.

Появление дополнительного повреждения ДНК вблизи объемного аддукта вызывает изменение локальной стабильности ДНК-дуплекса, которое зависит как от окружающей последовательности ДНК, так и от стереохимии самих повреждений [86] и в значительной степени определяет эффективность эксцизии объемного повреждения ДНК из состава кластера системой NER [7].

#### **1.5. Модельные системы для исследования механизма эксцизионной репарации нуклеотидов.**

Для изучения механизма взаимодействия ферментов и белковых факторов NER между собой и с ДНК применяется широкий спектр биохимических и молекулярно-биологических методов, включая подходы, основанные на использовании различных модельных ДНК-структур [7,80,186,232–234]. Ряд работ по изучению субстратных свойств был выполнен с использованием кольцевых структур, созданных на основе фаговой или плазмидной ДНК [235–237]. Также существует другой тип модельных структур, представляющих собой субстраты эукариотической системы NER, – линейные ДНК-дуплексы, содержащие модифицированные нуклеотидные и ненуклеотидные повреждения [7,87,90]. Для синтеза линейных ДНК-субстратов NER в основном используется метод ферментативного лигирования структуры, собранной из нескольких коротких ОДН-фрагментов, один из которых содержит повреждение [186,238]. Для синтеза линейных модельных ДНК был также разработан ферментативный метод [238], основанный на использовании соответствующих дезоксирибонуклеозидтрифосфатов, модифицированных по азотистому основанию, в качестве субстратов для ДНК-полимеразы  $\beta$  и последующем лигировании полученных модифицированных ДНК-структур, содержащих одноцепочечный разрыв, с помощью ДНК-лигазы.

Метод аффинной модификации, основанный на использовании в качестве ДНК-зондов аналогов субстратов и интермедиатов процессов репарации, позволяет получить данные о вза-

имодействии белков репарации с ДНК [124,239,240]. Метод основан на формировании специфических комплексов между белками и фотоактивируемым аналогом поврежденной ДНК и последующем образовании ковалентной связи между белком и фотоактивируемой группой, которое индуцируется УФ-облучением [241].

Модельные ДНК, созданные с использованием арилазидных производных dNTP (дезоксирибонуклеозидтрифосфатов), успешно используются при изучении ферментов и факторов систем репликации и репарации ДНК [238–240]. Арилазидные производные дезоксинуклеотидов являются эффективными фотореагентами и успешно используются при изучении белково-нуклеиновых взаимодействий. Облучение арилазидов УФ-светом с определенной длиной волны и энергии может приводить к образованию высокореакционноспособных нитренов, взаимодействующих с широким набором аминокислотных остатков [242,243].

Арилазидные производные с объемными заместителями, введенными по азотистому основанию могут рассматриваться как фотоактивируемые аналоги объемных повреждений, удаляемых системой NER [241]. Дополнительным преимуществом подобных производных является возможность варьирования типа фотоактивируемой группы, а также структуры и длины линкера, соединяющего эту группу с аффинной частью реагента [243]. Это, в свою очередь, позволяет повышать эффективность и селективность модификации биополимеров. Производные пиримидиновых нуклеотид-5'-трифосфатов, содержащие азидопиридинильные и азидобензоильные группировки, введенные с помощью линкеров в качестве объемных заместителей по гетероциклическому основанию, являются эффективными фотореагентами [238,244]. ДНК, содержащие фотоактивируемые нуклеотидные производные и при этом подвергающиеся эксцизии в процессе NER, представляются перспективным инструментом для изучения стадии верификации повреждения ДНК в процессе эксцизионной репарации нуклеотидов [244–246].

#### **1.4.6. Метод постэксцизионного мечения для определения эффективности эксцизии повреждений ДНК системой NER.**

Эксцизия фрагментов ДНК, содержащих повреждение, является ключевым этапом NER. Оценка эксцизионной активности дает представление о функциональном состоянии системы NER и может использоваться для измерения ее активности *in vitro* на уровне реконструированных из очищенных белков систем, а также клеточных экстрактов [186,247]. В этой работе использовался метод постэксцизионного мечения, разработанный в ЛБХФ [248]; ниже приведено его описание, схема метода представлена на рис. 9.

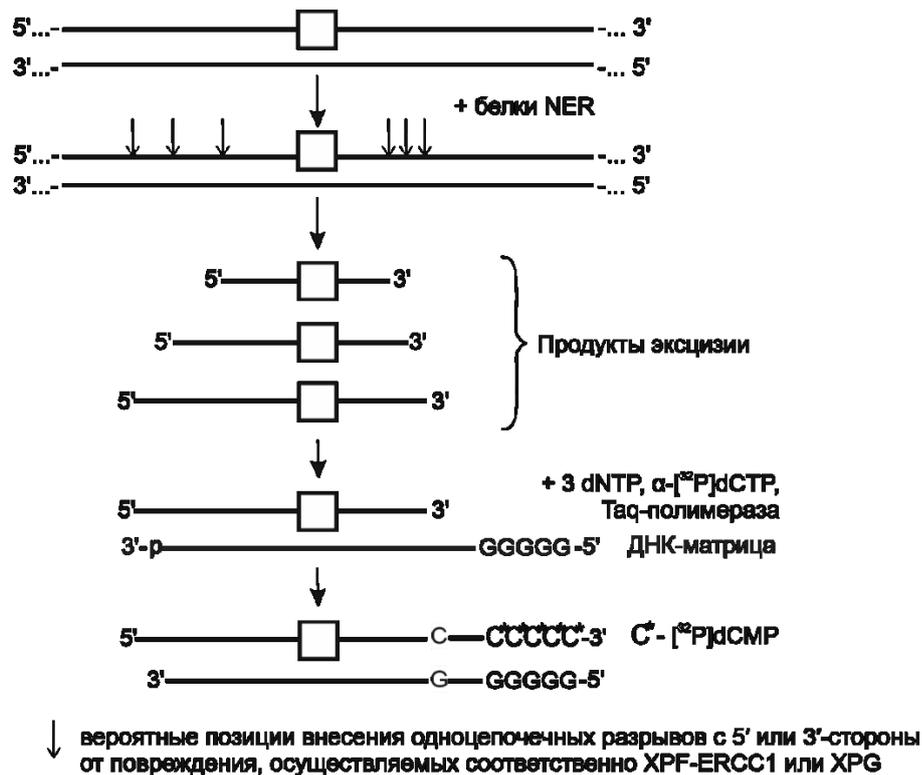


Рис. 9. Схема метода постэксцизионного мечения.

В качестве субстрата системой NER высших эукариот может использоваться дуплекс ДНК длиной более 120 п.о., содержащий повреждение во внутренней позиции одной из цепей, ближе к ее середине, т.е. для определения эффективности эксцизии в процессе NER необходимо использовать цепи с фланкирующими поврежденное звено областями не менее 60–70 нуклеотидов длиной [249]. Эффективность эксцизии, катализируемой системой NER, при использовании этого метода оценивают по уровню сигнала радиоактивной метки, которую вводят в продукты эксцизии с использованием ДНК-полимеразы,  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dCTP}$  и специфической матрицы, комплементарной участку вблизи повреждения. Использование в анализе ДНК-матрицы, комплементарной участку ДНК вблизи повреждения, позволяет повысить выход реакции за счет защиты одноцепочечного фрагмента, содержащего повреждение, от клеточных нуклеаз. В качестве дополнительного контроля в образцах заменяют специфическую матрицу, комплементарную участку, содержащему повреждение ДНК, на неспецифическую последовательность, которая соответствует участку неповрежденной цепи ДНК-дуплекса в области 5'-конца.

Использование такой методики обеспечивает высокий уровень чувствительности при снижении общего количества используемой радиоактивной метки. Кроме того, исключаются проблемы, связанные с синтезом и хранением высокордиоактивных протяженных ДНК-субстратов. При достройке на специфической матрице в подвергшиеся эксцизии системой NER фрагменты ДНК с 3'-конца включаются от 8 до 14 нуклеотидных звеньев, что уменьшает их электрофорети-

ческую подвижность. Данный метод позволяет проводить сравнение активностей NER в экстрактах, полученных из разных источников, а также сравнивать эффективность эксцизии различных объемных повреждений из модельных ДНК [186].

### 1.5. Заключение.

Система эксцизионной репарации нуклеотидов, NER, удаляет широкий спектр объемных повреждений ДНК, дестабилизирующих структуру двойной спирали. Процесс NER в клетках млекопитающих играет роль важного защитного механизма, поддерживающего стабильность генома и ограничивающего канцерогенез. Повреждения ДНК, и, как следствие, мутации, распределяются по геномной ДНК неравномерно, часто концентрируясь в определенных участках. Сниженная активность систем репарации в клетке в сочетании с интенсивным воздействием повреждающих агентов может приводить к появлению в ДНК кластеров повреждений.

В настоящее время молекулярный механизм репарации одиночных повреждений ДНК в пути общегеномной NER достаточно хорошо изучен. Однако количество исследований по репарации ДНК, содержащих объемные повреждения в составе кластеров, относительно невелико. В ряде исследований показано, что при появлении вблизи объемного аддукта дополнительного повреждения ДНК эффективность его эксцизии системой NER часто оказывается сниженной. В литературном обзоре рассмотрены различные причины подавленной эксцизии объемных повреждений ДНК, в том числе обусловленные непродуктивным связыванием фактора ХРС, инициирующего процесс общегеномной NER, с поврежденным участком ДНК. Выявление структурных свойств, характерных для устойчивых к репарации кластерных повреждений ДНК, представляет значительный интерес.

Данная работа посвящена исследованию репарации объемных повреждений ДНК, входящих в состав кластерных повреждений. Показано, что при расположении объемных повреждений ДНК в двухцепочечном кластере эффективность их эксцизии системой NER оказывается резко сниженной, при этом «зона влияния» второго повреждения, в пределах которой наблюдается подавление эксцизии, зависит от структуры удаляемого объемного повреждения ДНК. Сенсорный фактор ХРС-RAD23В проявляет повышенное сродство к ДНК, содержащим кластерные повреждения. Мы показали, что устойчивость к репарации модельного объемного ненуклеотидного повреждения (nFlu), расположенного в кластере с аналогом AP-сайта, обусловлена повышением стабильности смежной с nFlu области ДНК, а также возможностью взаимодействия между этими повреждениями, что препятствует формированию специфических комплексов фактора ХРС с ДНК и, в итоге, протеканию процесса NER. Выполненное исследование дополняет литературные данные о механизме репарации кластерных повреждений ДНК, а также об их потенциальной биологической значимости в клетках млекопитающих.

## Глава 2. Экспериментальная часть.

---

### 2.1. Исходные материалы.

#### 2.1.1. Используемые реагенты.

В работе были использованы следующие реактивы: Taq-полимераза, T4 ДНК-лигаза, T4 ПНК, урацил-ДНК-гликозилаза *E.coli* UDG и дезоксирибонуклеозидтрифосфаты (Биосан, Новосибирск), DEAE (диаминоэтиламиноэтилцеллюлозные) фильтры DE-81 (Whatman, Великобритания), мочевины и N,N'-метиленабисакриламид (Amresco, США), акриламид (Applichem, Германия), белковые маркеры молекулярной массы PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific, США), олигодезоксирибонуклеотиды (ОДН), [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]АТФ (3000 Ки/ммоль) и [ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ]dCTP (3000 Ки/ммоль) производства ИХБФМ СО РАН (Новосибирск), ТЕМЕД (Helicon, Россия), протеиназа К и таблетированный коктейль ингибиторов протеаз “Mini EDTA Free” (Roche, Германия), набор для определения концентрации белка Bradford Protein Assay (Bio-Rad, США), бензоназа (Novagen, Германия), бычий сывороточный альбумин (Bio-Rad, США).

Используемые в работе реактивы ПСА (персульфат аммония),  $\text{MgCl}_2$ ,  $\text{NaCl}$ ,  $\text{NaOH}$ ,  $\text{LiClO}_4$  были отечественного производства и квалификации ос.ч. (особо чистые). Для осаждения ДНК был использован перегнанный этанол. Кроме того, в работе использовались бромистый этидий, краситель StainsAll и раствор Кумасси G-250 для окраски гелей, трис(гидроксиэтил)аминометан (трис; Sigma, США), ЭДТА (этилендиаминтетрауксусная кислота), сульфат аммония.

Препараты рекомбинантных ферментов ДНК-полимеразы  $\beta$  и APE1 были любезно предоставлены д.х.н. Ходыревой С. Н. Препарат рекомбинантного гетеродимера XPC-RAD23B (FlagXPC и 6His-RAD23B), полученный по методике, описанной в работе [250] с небольшими модификациями, был любезно предоставлен к.х.н. Петрусевой И. О. Препараты рекомбинантных белков XPD и p44 гриба *Chaetomium thermophilum*, полученные по описанной в работе [251] методике, были любезно предоставлены к.х.н. Петрусевой И. О. и к.х.н. Анарбаевым Р. О.

#### 2.1.2. Синтетические олигодезоксирибонуклеотиды.

Последовательности всех ОДН, использованных в работе для создания модельных ДНК, приведены в приложении 1. Синтез олигодезоксирибонуклеотидов, включая ряд модифицированных ОДН, был выполнен в ЛМХ (ИХБФМ СО РАН). ОДН, содержащие модифицированные звенья Fab(5)-dC, nAnt и nFlu, представляют собой коммерческий продукт ООО «НаноТех-С», Новосибирск.

Цепи длиной 137 нт получали на основе ОДН длиной 54 нт соответствующей структуры (таблица 3), используя метод ферментативного лигирования. Для проведения экспериментов по определению углов изгиба осей ДНК-дуплексов и их термостабильности использовали 16-звенные ОДН, приведенные в таблице 4. Для синтеза FAM-меченых цепей, входящих в состав ДНК-

дуплексов (54 нт), использованных в экспериментах по флуоресцентному титрованию, проводили лигирование ОДН длиной 16 нт (таблица 4) с фланкирующими ОДН. Последовательности ДНК-дуплексов, использованных в эксперименте по оценке эффективности эксцизии AP-сайтов ферментом APE1, в приведены в таблице 5. Последовательности ДНК-зондов, использованных для фотоаффинной модификации гетеродимера XPD-p44, представлены в таблице 6. ОДН, использованные для удлинения модифицированных цепей ДНК и/или включения модифицированных звеньев с помощью ДНК-полимеразы  $\beta$ , приведены в таблице 7.

В таблицах 3-6 используются следующие обозначения: **A** и **F** – нуклеотидные объемные повреждения nAnt и nFlu, **D** – вставка на основе DEG, **C**, **B** и **P** – нуклеотидные объемные повреждения с объемными фотоактивируемыми группировками: Fab(5)-dC, Fab(g)-dC и Far-dC соответственно, **U** – dU.

Нумерация нуклеотидных звеньев в ДНК-дуплексах приведена в таблице 3 на примере ДНК nFlu/um (54 п.о.).

Таблица 3. Последовательности модельных ДНК-дуплексов (54/137 п.о.), использованных в экспериментах из разделов 3.2 и 3.3.

Обозначение ДНК-дуплекса	Последовательности ДНК-дуплексов 54 п.о. (137 п.о. – протяженный вариант)	Обозначение цепей: цепь 1 цепь 2
nFlu/um	-25   -20   -15   -10   -5   0   +5   +10   +15   +20   +25 5' - aagcctatgcctacagcatccaggg <b>F</b> gacggtgccgaggatgacgatgagcgca     3' - ttccgatacggatgtcgttaggtcccgctgccacggctcctactgctactcgcgt -25   -20   -15   -10   -5   0   +5   +10   +15   +20   +25	nFlu
		um
nFlu/DEG <sub>-20</sub>	5' - aagcctatgcctacagcatccaggg <b>F</b> gacggtgccgaggatgacgatgagcgca     3' - ttccg <b>D</b> tacggatgtcgttaggtcccgctgccacggctcctactgctactcgcgt	nFlu
		DEG <sub>-20</sub>
nFlu/DEG <sub>-10</sub>	5' - aagcctatgcctacagcatccaggg <b>F</b> gacggtgccgaggatgacgatgagcgca     3' - ttccgatacggatgt <b>D</b> gtaggtcccgctgccacggctcctactgctactcgcgt	nFlu
		DEG <sub>-10</sub>
nFlu/DEG <sub>-6</sub>	5' - aagcctatgcctacagcatccaggg <b>F</b> gacggtgccgaggatgacgatgagcgca     3' - ttccgatacggatgtcgt <b>D</b> gtcccgctgccacggctcctactgctactcgcgt	nFlu
		DEG <sub>-6</sub>
nFlu/DEG <sub>-3</sub>	5' - aagcctatgcctacagcatccaggg <b>F</b> gacggtgccgaggatgacgatgagcgca     3' - ttccgatacggatgtcgttaggt <b>D</b> ccgctgccacggctcctactgctactcgcgt	nFlu
		DEG <sub>-3</sub>
nFlu/DEG <sub>0</sub>	5' - aagcctatgcctacagcatccaggg <b>F</b> gacggtgccgaggatgacgatgagcgca     3' - ttccgatacggatgtcgttaggtccc <b>D</b> ctgccacggctcctactgctactcgcgt	nFlu
		DEG <sub>0</sub>
nFlu/DEG <sub>+4</sub>	5' - aagcctatgcctacagcatccaggg <b>F</b> gacggtgccgaggatgacgatgagcgca     3' - ttccgatacggatgtcgttaggtcccgctg <b>D</b> cacggctcctactgctactcgcgt	nFlu
		DEG <sub>+4</sub>

nFlu/DEG <sub>+6</sub>	5'-aagcctatgcctacagcatccaggg <b>F</b> gacgggtgccgaggatgacgatgagcgca 	nFlu
	3'-ttcggatacggatgtcgttaggtcccgctgcc <b>D</b> cggtcctactgctactcgcgt	DEG <sub>+6</sub>
nFlu/DEG <sub>+8</sub>	5'-aagcctatgcctacagcatccaggg <b>F</b> gacgggtgccgaggatgacgatgagcgca 	nFlu
	3'-ttcggatacggatgtcgttaggtcccgctgccac <b>D</b> gctcctactgctactcgcgt	DEG <sub>+8</sub>
Fab(5)- dC/um	5'-aagcctatgcctacagcatccaggg <b>C</b> gacgggtgccgaggatgacgatgagcgca 	Fab(5)-dC
	3'-ttcggatacggatgtcgttaggtcccgctgccacgggtcctactgctactcgcgt	um
Fab(5)- dC/nFlu <sub>-20</sub>	5'-aagcctatgcctacagcatccaggg <b>C</b> gacgggtgccgaggatgacgatgagcgca 	Fab(5)-dC
	3'-ttcgg <b>F</b> tacggatgtcgttaggtcccgctgccacgggtcctactgctactcgcgt	nFlu <sub>-20</sub>
Fab(5)- dC/nFlu <sub>-10</sub>	5'-aagcctatgcctacagcatccaggg <b>C</b> gacgggtgccgaggatgacgatgagcgca 	Fab(5)-dC
	3'-ttcggatacggatgt <b>F</b> gtaggtcccgctgccacgggtcctactgctactcgcgt	nFlu <sub>-10</sub>
Fab(5)- dC/nFlu <sub>-3</sub>	5'-aagcctatgcctacagcatccaggg <b>C</b> gacgggtgccgaggatgacgatgagcgca 	Fab(5)-dC
	3'-ttcggatacggatgtcgttaggt <b>F</b> ccgctgccacgggtcctactgctactcgcgt	nFlu <sub>-3</sub>
Fab(5)- dC/nFlu <sub>0</sub>	5'-aagcctatgcctacagcatccaggg <b>C</b> gacgggtgccgaggatgacgatgagcgca 	Fab(5)-dC
	3'-ttcggatacggatgtcgttaggtccc <b>F</b> ctgccacgggtcctactgctactcgcgt	nFlu <sub>0</sub>
Fab(5)- dC/nFlu <sub>+4</sub>	5'-aagcctatgcctacagcatccaggg <b>C</b> gacgggtgccgaggatgacgatgagcgca 	Fab(5)-dC
	3'-ttcggatacggatgtcgttaggtcccgctg <b>F</b> cacgggtcctactgctactcgcgt	nFlu <sub>+4</sub>
Fab(5)- dC/nFlu <sub>+4</sub>	5'-aagcctatgcctacagcatccaggg <b>C</b> gacgggtgccgaggatgacgatgagcgca 	Fab(5)-dC
	3'-ttcggatacggatgtcgttaggtcccgctgccac <b>F</b> gctcctactgctactcgcgt	nFlu <sub>+8</sub>
nAnt/um	5'-aagcctatgcctacagcatccaggg <b>A</b> gacgggtgccgaggatgacgatgagcgca 	nAnt
	3'-ttcggatacggatgtcgttaggtcccgctgccacgggtcctactgctactcgcgt	um
nAnt/nFlu <sub>-20</sub>	5'-aagcctatgcctacagcatccaggg <b>A</b> gacgggtgccgaggatgacgatgagcgca 	nAnt
	3'-ttcgg <b>F</b> tacggatgtcgttaggtcccgctgccacgggtcctactgctactcgcgt	nFlu <sub>-20</sub>
nAnt/nFlu <sub>-10</sub>	5'-aagcctatgcctacagcatccaggg <b>A</b> gacgggtgccgaggatgacgatgagcgca 	nAnt
	3'-ttcggatacggatgt <b>F</b> gtaggtcccgctgccacgggtcctactgctactcgcgt	nFlu <sub>-10</sub>
nAnt/nFlu <sub>-3</sub>	5'-aagcctatgcctacagcatccaggg <b>A</b> gacgggtgccgaggatgacgatgagcgca 	nAnt
	3'-ttcggatacggatgtcgttaggt <b>F</b> ccgctgccacgggtcctactgctactcgcgt	nFlu <sub>-3</sub>
nAnt/nFlu <sub>0</sub>	5'-aagcctatgcctacagcatccaggg <b>A</b> gacgggtgccgaggatgacgatgagcgca 	nAnt
	3'-ttcggatacggatgtcgttaggtccc <b>F</b> ctgccacgggtcctactgctactcgcgt	nFlu <sub>0</sub>
nAnt/nFlu <sub>+4</sub>	5'-aagcctatgcctacagcatccaggg <b>A</b> gacgggtgccgaggatgacgatgagcgca 	nAnt
	3'-ttcggatacggatgtcgttaggtcccgctg <b>F</b> cacgggtcctactgctactcgcgt	nFlu <sub>+4</sub>
nAnt/nFlu <sub>+8</sub>	5'-aagcctatgcctacagcatccaggg <b>F</b> gacgggtgccgaggatgacgatgagcgca 	nAnt
	3'-ttcggatacggatgtcgttaggtcccgctgccac <b>D</b> gctcctactgctactcgcgt	nFlu <sub>+8</sub>

Таблица 4. Последовательности ДНК-дуплексов 16 п.о., использованных в экспериментах из разделов 3.2.3, 3.3.2, 3.4.2.

Обозначение ДНК-дуплекса	Последовательности ДНК-дуплексов (16 п.о.)	Обозначение цепь 1 цепь 2
DEG/um	5'-atccaggg <b>D</b> gacggtg       3'-taggtcccgctgccac	DEG
		um
nFlu/um	5'-atccaggg <b>F</b> gacggtg       3'-taggtcccgctgccac	nFlu
		um
nAnt/um	5'-atccaggg <b>A</b> gacggtg       3'-taggtcccgctgccac	nAnt
		um
nAnt/nFlu <sub>3</sub>	5'-atccaggg <b>A</b> gacggtg       3'-taggt <b>F</b> ccgctgccac	nAnt
		nFlu <sub>3</sub>
nAnt/nFlu <sub>0</sub>	5'-atccaggg <b>A</b> gacggtg       3'-taggtccc <b>F</b> ctgccac	nAnt
		nFlu <sub>0</sub>
nAnt/nFlu <sub>+4</sub>	5'-atccaggg <b>A</b> gacggtg       3'-taggtcccgctg <b>F</b> cac	nAnt
		nFlu <sub>+4</sub>
Fab(5)-dC/um	5'-atccaggg <b>C</b> gacggtg       3'-taggtcccgctgccac	Fab(5)-dC
		um
Fab(5)-dC/nFlu <sub>3</sub>	5'-atccaggg <b>C</b> gacggtg       3'-taggt <b>F</b> ccgctgccac	Fab(5)-dC
		nFlu <sub>3</sub>
Fab(5)-dC/nFlu <sub>0</sub>	5'-atccaggg <b>C</b> gacggtg       3'-taggtccc <b>F</b> ctgccac	Fab(5)-dC
		nFlu <sub>0</sub>
Fab(5)-dC/nFlu <sub>+4</sub>	5'-atccaggg <b>C</b> gacggtg       3'-taggtcccgctg <b>F</b> cac	Fab(5)-dC
		nFlu <sub>+4</sub>

Таблица 5. Структуры ДНК-дуплексов, использованных для определения эффективности инцизии цепей ДНК, содержащих AP-сайт, ферментом APE1 (раздел 3.3.3).

Обозначение ДНК-дуплекса	Последовательность ДНК-дуплекса (54 п.о.)
AP/um	5'-aagcctatgcctacagcatccaggg <b>U</b> gacggtgccgaggatgacgatgagcgca       3' -ttcggatacggatgtcgttaggtcccgcgtgccacggctcctactgctactcgcgt
AP/DEG-3	5'-aagcctatgcctacagcatccaggg <b>U</b> gacggtgccgaggatgacgatgagcgca       3' -ttcggatacggatgtcgttaggt <b>F</b> ccgcgtgccacggctcctactgctactcgcgt
AP/DEG <sub>0</sub>	5'-aagcctatgcctacagcatccaggg <b>U</b> gacggtgccgaggatgacgatgagcgca       3' -ttcggatacggatgtcgttaggtccc <b>F</b> ctgccacggctcctactgctactcgcgt
AP/DEG <sub>+4</sub>	5'-aagcctatgcctacagcatccaggg <b>U</b> gacggtgccgaggatgacgatgagcgca       3' -ttcggatacggatgtcgttaggtcccgcgtg <b>F</b> cacggctcctactgctactcgcgt

Таблица 6. Структуры модельных ДНК, использованных в разделе 3.4.

Обозначение ДНК-зонда	Последовательность
А. 54-звенные ДНК-дуплексы, использованные в экспериментах из разделов 3.4.3 и 3.4.5	
оц ДНК um	5'-aagcctatgcctacagcatccagggcgacggtgccgaggatgacgatgagcgca
дц ДНК um	5'-aagcctatgcctacagcatccagggcgacggtgccgaggatgacgatgagcgca       3' -ttcggatacggatgtcgttaggtcccgcgtgccacggctcctactgctactcgcgt
оц Fab(g)-dC	5'-aagcctatgcctacagcatccaggg <b>B</b> gacggtgccgaggatgacgatgagcgca
дц Fab(g)-dC/um	5'-aagcctatgcctacagcatccaggg <b>B</b> gacggtgccgaggatgacgatgagcgca       3' -ttcggatacggatgtcgttaggtcccgcgtgccacggctcctactgctactcgcgt
оц Far-dC	5'-aagcctatgcctacagcatccaggg <b>P</b> gacggtgccgaggatgacgatgagcgca
дц Far-dC/um	5'-aagcctatgcctacagcatccaggg <b>P</b> gacggtgccgaggatgacgatgagcgca       3' -ttcggatacggatgtcgttaggtcccgcgtgccacggctcctactgctactcgcgt
Б. 49-звенные одноцепочечные ДНК, использованные в эксперименте из раздела 3.4.4	
оц ДНК um	5'-atgcctacagcaagcctatgcctacagcatccagggcgacggtgccgag-Cy3
оц Fab(5)-dC	5'-atgcctacagcaagcctatgcctacagcatccaggg <b>C</b> gacggtgccgag-Cy3
оц Fab(g)-dC	5'-atgcctacagcaagcctatgcctacagcatccaggg <b>B</b> gacggtgccgag-Cy3
оц Far-dC	5'-atgcctacagcaagcctatgcctacagcatccaggg <b>P</b> gacggtgccgag-Cy3
В. ДНК-зонды (54/38 нт) с одиночными повреждениями (раздел 3.4.5)	
фс Far-dC/um	5'-aagcctatgcctacagcatccaggg <b>P</b> gacggtgccgaggatgacgatgagcgca       3' -gttaggtcccgcgtgccacggctcctactgctactcgcgt
фс Fab(g)-dC/um	5'-aagcctatgcctacagcatccaggg <b>B</b> gacggtgccgaggatgacgatgagcgca       3' -gttaggtcccgcgtgccacggctcctactgctactcgcgt
оц Fab(5)-dC	5'-aagcctatgcctacagcatccaggg <b>C</b> gacggtgccgaggatgacgatgagcgca
фс Fab(5)-dC/um	5'-aagcctatgcctacagcatccaggg <b>C</b> gacggtgccgaggatgacgatgagcgca       3' -gttaggtcccgcgtgccacggctcctactgctactcgcgt

Таблица 7. ОДН, использованные для удлинения модифицированных цепей путем лигирования и/ или включения модифицированных звеньев с помощью ДНК-полимеразы  $\beta$ .

Обозначение полученной цепи ДНК	«Центральный» компонент при лигировании	Фланкирующие ОДН	Матрица для лигирования ОДН
Цепь 1 (137 нт)			
um / Fab(5)-dC / nAnt / nFlu / DEG	p-5'-um / Fab(5)-dC / nAnt / nFlu / DEG (54 нт)	ОДН-1, ОДН-2	ОДН-3, ОДН-4
Fab(g)-dC / Fap-dC / Fap-dU	Достройка ОДН-5 с использованием производного пиримидинового нуклеотид-5'-трифосфата, лигирование с ОДН-6 на матрице ОДН-7		
Цепь 1 (54 нт)			
FAM-5'-nFlu / um	p-5'-um / Fab(5)-dC / nAnt / nFlu (16 нт)	ОДН-8, ОДН-9	ОДН-10
Fab(5)-dC / nAnt	Fab(5)-dC / nAnt (16 нт)	ОДН-9, ОДН-11	ОДН-10
Fab(g)-dC / Fap-dC / Fap-dU	Достройка ОДН-12 с использованием модифицированного трифосфата, лигирование с ОДН-13 на матрице ОДН-7		
Цепь 2 (137 нт)			
um / nFlu-20...+8 / DEG-20...+8	p-5'-um / nFlu-20...+8 / DEG-20...+8 (54 нт)	ОДН-14, ОДН-15	ОДН-16, ОДН-17

### 2.1.3. Буферные растворы, использованные в работе.

1. 10x TE: 100 mM Трис-НСl pH 7.6, 10 mM ЭДТА.
2. 5x TBE: 445 mM Трис, 445 mM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 10 mM ЭДТА.
3. 1x TGB: 25 mM Трис, 192 mM глицин, 0.1% SDS.
4. 10x натрий-фосфатный буфер (PBS): 17 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 52 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.5 M NaCl.
5. 10x T4 ПНК буфер: 700 mM Трис-НСl pH 7.6, 100 mM MgCl<sub>2</sub>.
6. 10x NER буфер: 250 mM Трис-НСl pH 7.8, 450 mM NaCl, 44 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM ЭДТА, 8 mM АТР.
7. Буфер для NER-компетентных экстрактов: 25 mM Трис pH 7.9, 100 mM NaCl, 12 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5 mM ЭДТА, 2 mM дитиотреитол, 12% глицерин.

8. 10x буфер для модификации 1 (использовали при фотоаффинной модификации комплекса ХРС-RAD23В): 250 мМ Трис-НСl рН 7.8, 50 мМ MgCl<sub>2</sub>, 250 мМ NaCl, 1.27 мМ β-меркаптоэтанол.
9. 10x буфер для бензоназы: 250 мМ Трис-НСl рН 8.6, 20 мМ MgCl<sub>2</sub>.
10. 10x буфер для модификации 2 (пользовали при фотоаффинной белков ХРD и р44): 200 мМ HEPES (4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота) рН 7.5, 500 мМ KCl, 50 мМ MgCl<sub>2</sub>, 10 мМ TCEP.
10. 5x буфер для связывания 1 (использовали при определении эффективности комплексообразования фактора ХРС-RAD23В с ДНК): 250 мМ Трис-НСl рН 7.5, 500 мМ NaCl, 25 мМ MgCl<sub>2</sub>, 5 мМ дитиотреитол, 0.5 мг/мл БСА (бычий сывороточный альбумин).
11. 5x буфер для связывания 2 (использовали при определении эффективности комплексообразования белка ХРD с ДНК): 100 мМ Трис (рН 7.4), 250 мМ KCl, 5 мМ DTT (дитиотреитол), 0.5 мг/мл БСА, 0.5 мМ ЭДТА, 0.25% NP-40, 40% глицерол.
12. Буфер для разведения Таq-полимеразы: 50 мМ NaCl, 50 мМ Трис-НСl рН 7.5, 1 мМ дитиотреитол, 0.1 мМ ЭДТА, 1% Triton X-100, 50% глицерин.
13. Буфер для разведения протеиназы К: 10 мМ Трис-НСl рН 8.0, 10 мМ CaCl<sub>2</sub>, 20% глицерин
14. Гипотонический буфер лизиса: 10 мМ Трис-НСl рН 8.0, 1 мМ ЭДТА, 5 мМ дитиотреитол, коктейль ингибиторов протеаз (Roche, Германия).
15. Сахарозно-глицериновый буфер: 50 мМ Трис-НСl рН 8.0, 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 2 мМ дитиотреитол, 25% сахароза, 50% глицерин.
16. Буфер для подготовки образцов к электрофоретическому анализу нуклеиновых кислот в неденатурирующих условиях содержал 50% глицерин, ~0.05% бромфеноловый синий в TBE.
17. Буфер для подготовки образцов к электрофоретическому анализу нуклеиновых кислот в денатурирующих условиях содержал 7 М мочевины, ~0.05% ксиленцианол, ~0.05% бромфеноловый синий в формамиде.
18. Буфер для подготовки образцов к электрофоретическому анализу белков в денатурирующих условиях по Леммли содержал 200 мМ Трис-НСl рН 6.8, 400 мМ β-меркаптоэтанол, ~0.01% бромфеноловый синий, 4% SDS, 50% глицерин.

#### **2.1.4. Оборудование.**

Реакционные смеси и другие пробы инкубировали в термостате Biosan (Россия). Электрофорез проводили с применением источников питания Эльф-8 (ДНК-Технология, Россия) и PowerPac HC (Bio-Rad, США). Оптическую плотность растворов ОДН и белков измеряли при

температуре 20-25 °С с использованием спектрофотометра-U-0080D “Hitachi” (Япония). Использовали центрифугу с охлаждением 5430 R Eppendorf и микроцентрифугу MiniSpin Plus (Eppendorf, Германия), а также центрифугу-вортекс «Микроспин» FV-2400 (Biosan, Россия). Растворы олигодезоксирибонуклеотиды концентрировали в центрифужном испарителе Eppendorf Concentrator plus (Eppendorf, Германия). Интенсивность флуоресценции ДНК в планшетах детектировали с помощью флуориметра Clariostar plate reader (BMG Labtech, Германия). При анализе радиоактивных образцов радиоавтографы гелей получали с использованием экрана Imaging ScreenK. Радиоактивные сигналы детектировали с помощью сканера “Typhoon FLA 9500” (GE Healthcare, США) или “Molecular Imager FX” (Bio-Rad, США), радиоавтографы гелей анализировали с использованием программ “Quantity One 4.6.8”, Gel-Pro Analyzer 4.0 (Media Cybernetics, L.P.), обработку данных проводили с использованием OriginPro 9.0 (OriginLab Corporation, США).

## **2.2. Основные методы работы.**

### **2.2.1. Получение препаратов NER-компетентных экстрактов.**

#### **2.2.1.1. Получение препарата NER-компетентного цельноклеточного экстракта.**

NER-компетентные экстракты клеток CHO были приготовлены по методике, описанной в работе [252]. Работу проводили при температуре 4°C. Клетки, предварительно собранные и промытые PBS, ресуспендировали в четырех PCV (от англ. “packed cell volume”) гипотонического буфера лизиса. Клетки выдерживали во льду в течение 20 минут, затем разрушали при помощи стеклянного гомогенизатора Поттера (20 движений пестика В).

К полученному гомогенату, находящемуся в ледяной бане, медленно и при осторожном перемешивании добавляли 4 PCV сахарозно-глицеринового буфера и 1 PCV насыщенного раствора  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (pH 7.0). Далее проводили его ультрацентрифугирование в течение 3 часов при 100000 g. Супернатант собирали и добавляли к нему сухой  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  из соотношения 0.33 г на мл супернатанта, при этом на каждый грамм  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  добавляли по 10 мкл 1 М NaOH для поддержания нейтрального pH. Экстракт перемешивали в течение 30 минут. Осажденные белки собирали при помощи центрифугирования (45 минут, 12000g) при 4°C.

Осадок растворяли в минимальном объеме (1 PCV) буфера для NER-компетентных экстрактов. Нерастворимый осадок удаляли при помощи микроцентрифугирования (10 мин, 13400g, 4°C). Полученный клеточный экстракт разделяли на аликвоты, замораживали в жидком азоте и хранили при -80°C.

Концентрацию белка определяли по методике Бредфорда [253], с использованием реагента Бредфорда (Bio-Rad). В процессе измерения смешивали раствор, содержащий белковый образец и раствор красителя в равных объемах и после выдерживания 10-15 мин при комнатной температуре измеряли оптическую плотность при длине волны 595 нм. Концентрацию белка

определяли по калибровочной кривой, построенной с использованием БСА (Bio-Rad) в качестве стандарта.

### ***2.2.1.2. Получение препарата NER-компетентного экстракта из печени домашнего кролика *Oryctolagus cuniculus*.***

Кролика, содержащегося на стандартной диете, 12 часов до умерщвления держали без питания. Животное забивали, печень быстро вырезали и немедленно удаляли из печени кровь с помощью промывки избытком PBS буфера при комнатной температуре. При проведении последних двух промывок использовали PBS, к которому был добавлен коктейль ингибиторов протеаз до концентрации 1 мМ. Полученный препарат обескровленной печени, разделенный на порции примерно по 30 г каждая, замораживали в азоте и помещали в кельвинатор (-80°C), где и хранили до момента приготовления экстракта.

Для приготовления экстракта печень размораживали на льду и измельчали скальпелем на кусочки 3x5 мм. Используя стеклянный гомогенизатор и пестик А, разрушали ткань на льду до гомогенности. Затем с помощью пестика разрушали клетки. С помощью гипотонического буфера лизиса гомогенат переносили в стаканчик, стоящий на льду. Дальнейшую обработку полученного гомогената проводили по методике 3.2.1.1.

### **2.2.2. Электрофоретический анализ нуклеиновых кислот и белков.**

#### ***2.2.2.1. Электрофорез в неденатурирующих условиях.***

Раствор мономеров, использовавшийся для приготовления гелей, содержал 5%, 8% или 10% акриламид и N,N'-метиленабисакриламид в соотношении 60:1 или 40:1 соответственно в 1xTBE-буфере. Полимеризующие агенты использовали из расчета 10 мкл водного 10% раствора ПСА и 1.5 мкл ТЕМЕД на 1 мл раствора мономеров. Перед нанесением на гель к пробам добавляли соответствующий буфер для подготовки образцов. Электрофорез проводили при напряжённости поля 15 В/см, в качестве электродного буфера для электрофореза нуклеиновых кислот использовали 1xTBE.

#### ***2.2.2.2. Электрофорез в денатурирующих условиях.***

Растворы мономеров, использовавшиеся для приготовления гелей, содержали 10-20% акриламид и N,N'-метиленабисакриламид (20:1) и 7 М мочевины в 1xTBE-буфере. Полимеризующие агенты использовали из расчета 10 мкл водного 10% раствора ПСА и 1.5 мкл ТЕМЕД на 1 мл раствора мономеров. Перед нанесением на гель к пробам добавляли соответствующий буфер для подготовки образцов и прогревали 10 мин при 85°C. Электрофорез проводили при напряжённости поля 15 В/см, в качестве электродного буфера для электрофореза нуклеиновых кислот использовали 1xTBE.

### **2.2.2.3. Электрофорез белков в денатурирующих условиях по Леммли [254].**

Разделяющий гель содержал 10% акриламид, N,N'-метиленбисакриламид (75:1), 560 мМ Трис-НСl pH 8.8, 0.15% SDS. Полимеризующие агенты для разделяющего геля использовали из расчета 10 мкл водного 10% раствора ПСА и 0.8 мл ТЕМЕД на 1 мл раствора мономеров.

Концентрирующий гель содержал 5% акриламид, N,N'-метиленбисакриламид (75:1), 63 мМ Трис-НСl pH 6.8, 0.05% SDS. Полимеризующие агенты использовали из расчета 10 мкл водного 10% раствора ПСА и 1 мкл ТЕМЕД на 1 мл раствора мономеров.

Перед нанесением на гель к пробам добавляли соответствующий буфер для подготовки образцов (¼ объема) и прогревали 10 мин при 85°C. Электрофорез проводили при напряженности поля 15 В/см, в качестве электродного буфера использовали 1xTGB.

### **2.2.2.4. Обработка гелей.**

При анализе нерадиоактивных ДНК гели окрашивали бромистым этидием или красителем StainsAll. Для детекции полос ДНК в геле, окрашенном бромистым этидием или содержащем флуоресцеин, в ряде случаев использовали сканер Typhoon FLA 9500 (GE Healthcare) или Molecular Imager FX (Bio-Rad). Белки в гелях окрашивали с помощью раствора Кумасси R-250.

При анализе радиоактивных образцов радиоавтографы гелей получали с использованием экрана Imaging ScreenK. Радиоактивные сигналы детектировали с помощью сканеров Typhoon FLA 9500 (GE Healthcare) и Molecular Imager FX (Bio-Rad), радиоавтографы гелей анализировали с использованием программ Quantity One 4.6.8, Gel-Pro Analyzer 4.0 (Media Cybernetics, L.P.) и OriginPro 7.5 (OriginLab Corporation).

## **2.2.3. Получение протяженных модельных ДНК-дуплексов и фотоактивируемых ДНК-зондов.**

### **2.2.3.1. 5'-Фосфорилирование олигодезоксирибонуклеотидов.**

Фосфорилирование 5'-концов олигодезоксирибонуклеотидов проводили с помощью фермента Т4 ПНК. Реакционная смесь содержала: 250-300 мкМ ОДН,  $\gamma$ -[<sup>32</sup>P]-dATP (5-10 МБк) или 10 мМ нерадиоактивный АТР и Т4 ПНК (1 ед. акт. на 10 пмоль ОДН) в буфере для Т4 ПНК. Реакцию проводили в течение 1-3 часов при 37°C. Фермент инактивировали инкубацией смеси при 75°C в течение 15 минут.

### **2.2.3.2. Достройка праймеров ДНК-полимеразой $\beta$ с использованием фотоактивируемых аналогов dNTP.**

Реакционная смесь содержала 5 мкМ ДНК с однонуклеотидным гэпом, 50 мкМ аналог dNTP (Fap-dCTP или Fab(g)-dCTP), ДНК-полимеразу  $\beta$  (1-2 мкг на 30 мкл реакционной смеси) и буфер для Т4 ПНК. Реакцию проводили при температуре 30°C в течение 1-2 часов.

### **2.2.3.3. Лигирование одноцепочечных разрывов в ДНК-дуплексе.**

Для создания ДНК-дуплекса компоненты реакции лигирования смешивали в эквимольном соотношении. Смесь инкубировали 5 минут при 85°C, после чего медленно (~1°C/мин) остужали до комнатной температуры. Реакционная смесь для лигирования содержала 250-300 мкМ ДНК-дуплекс, 4 мМ АТР и Т4 ДНК-лигазу (50 ед. акт. на 100 пмоль разрывов) в ПНК-буфере. Реакцию проводили 16 часов при 12°C.

Продукты реакции лигирования анализировали с помощью электрофореза по методике 2.2.2.2 с последующим сканированием радиоавтографа.

### **2.2.3.3. Выделение целевого олигодезоксирибонуклеотида.**

а). Электрофорез.

Для выделения целевого ОДН компоненты лигазной смеси разделяли электрофорезом в 10% ПААГ в денатурирующих условиях по методике 3.3.2.

б). Электроэлюция.

ДНК выделяли из геля методом электроэлюции. Для этого участок геля, содержащий целевой ОДН, вырезали и проводили электроперенос ДНК на DEAE-бумагу DE-81 в ячейке для электроэлюции (электродный буфер для электропереноса – 0.5xTBE, напряжённость поля 20 В/см).

в). Элюция с DEAE-бумаги 3М раствором LiClO<sub>4</sub>.

С DEAE-бумаги ОДН элюировали 3 М LiClO<sub>4</sub> тремя порциями по 30 мкл, инкубируя каждой порцией элюента по 5 минут при 75°C.

### **2.2.3.4. Осаждение ДНК ацетоном в присутствии LiClO<sub>4</sub>.**

Для осаждения к элюату, полученному на предыдущей стадии, добавляли пятикратный избыток ацетона. После выдерживания в течение 18 часов при -20°C осадок собирали центрифугированием (10 мин, 4°C) и промывали тремя порциями по 1 мл холодного ацетона, каждый раз центрифугируя (10 мин, 4°C). Остатки ацетона удаляли с помощью центрифужного испарителя. Полученный осадок растворяли в буфере TE. Количество выделенной ДНК в полученном препарате определяли по оптической плотности раствора при длине волны 260 нм на спектрофотометре Hitachi U0080D (Япония).

### **2.2.3.5. Формирование модельных ДНК-дуплексов.**

Для формирования ДНК-дуплексов смесь, содержащую комплементарные цепи ДНК в эквимольных соотношениях в 10 мМ Трис-НСl (рН 7.8) выдерживали при 85°C в течение 5 мин, после чего медленно (~1°C/мин) охлаждали до комнатной температуры. Полученные ДНК-дуплексы анализировали методом электрофореза в неденатурирующих условиях по методике 2.2.2.1. Во всех случаях доля образовавшегося ДНК-дуплекса была выше 95%.

## 2.2.4. Методики экспериментов.

### 2.2.4.1. Определение угла изгиба ДНК-дуплекса, индуцированного присутствием повреждения.

Относительное изменение подвижности ДНК-дуплекса при введении объемного повреждения определяли, сравнивая подвижности модифицированного и немодифицированного ДНК-дуплексов при разделении в 10% ПААГ в неденатурирующих условиях с последующей радиоавтографией (метод 2.2.2.1).

### 2.2.4.2. Определение температуры плавления ДНК-дуплексов.

Температуру плавления ДНК-дуплексов длиной 16 п.о. определяли методом дифференциального плавления на базе спектрофотометра Cary 300 Bio (Varian Inc., Австралия). Образцы содержали 2.5 мкМ ДНК в водном растворе 10 мМ какодилата натрия (рН 7.2). Детекцию поглощения осуществляли на трех длинах волн (260, 270 и 300 нм). Значения, полученные при 300 нм, использовались в качестве контроля. Данные измерений, полученных при длинах волн 260 и 270 нм, были усреднены.

### 2.2.4.3. Исследование эффективности образования комплексов фактора ХРС-RAD23В с ДНК методом торможения в геле.

Эффективность связывания белка ХРС с модельными ДНК определяли методом торможения ДНК в геле. Реакционные смеси, содержащие 10 нМ дц ДНК (54 п.о.) и гетеродимер ХРС-RAD23В, концентрацию которого варьировали, инкубировали в буфере для связывания 1: 50 мМ Трис-НСl (рН 7.5), 100 мМ NaCl, 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 1 мМ дитиотреитол (ДТТ), 0.1 мг/мл БСА – в течение 20 мин при 37°C. Затем проводили электрофорез в неденатурирующих условиях в 5%-ном ПААГ 1:60 при 4°C с последующей радиоавтографией.

Расчет величин EC50 (полумаксимальных эффективных концентраций) для связывания белка ХРС с модельными ДНК проводили с использованием уравнения Хилла:

$$y = y_{min} + \frac{y_{max} - y_{min}}{\left(\frac{EC50}{x}\right)^{n+1}} \quad (1),$$

где  $x$  – концентрация белка,  $y_{min}$  и  $y_{max}$  – минимальное и максимальное значения на кривой титрования соответственно,  $n$  – коэффициент Хилла.

Величина EC50 обозначала концентрацию белка, при которой достигается половина от максимального насыщения его комплексов с ДНК. Концентрацию активного белка в препарате определяли как описано в работе [244].

#### ***2.2.4.4. Исследование эффективности образования комплексов белка XPD с ДНК методом торможения в геле.***

Реакционные смеси, содержащие 100 нМ 5'-[<sup>32</sup>P]-меченую ДНК инкубировали с 25-750 нМ белком XPD в буфере для связывания 2, содержащем 20 мМ Трис (рН 7.4), 50 мМ КСl, 1 мМ DTT, 0.1 мг/мл БСА, 0.1 мМ ЭДТА, 0.5% NP-40 и 8% глицерин, в течение 15 мин при 30 °С. Комплексы белок-ДНК стабилизировали добавлением 1 мкл 5% глутарового альдегида и выдерживали смеси в течение 3 мин при 30 °С. Образцы анализировали при помощи электрофореза в 6% нативном геле в 1xTBE буфере при 4°С. Гели высушивали и применяли к ним стандартные методы анализа – автордиографию с использованием Typhoon FLA 9500 (GE Healthcare) и программного обеспечения (Quantity One).

#### ***2.2.4.5. Определение значений EC50 для связывания белков репарации с модельными ДНК методом измерения анизотропии флуоресценции.***

Значения EC50 для связывания комплексов белков XPC или XPD-p44 с ДНК определяли методом измерения анизотропии флуоресценции. Измерения проводили с помощью прибора Clariostar microplate reader (BMG Labtech GmbH, Germany), для обработки полученных данных использовали программное обеспечение MARS Data Analysis Software (BMG Labtech GmbH, Германия) и пакет программ OriginPro 9.0 (OriginLab, США). Реакционные смеси в 384-луночном планшете (Corning, США) облучали поляризованным светом.

При определении значений EC50 комплексов белка XPC с ДНК измерения проводили при 25°С в буфере для связывания 1 (50 мМ Трис-HCl, рН 7.8, 100 мМ NaCl, 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 1 мМ DTT, 0.1 мг/мл БСА), при постоянной концентрации ДНК (5 нМ). Используемые ДНК были длиной 54 п.о. и содержали кластерное повреждение во внутренних позициях цепей, а также метку FAM на 5'-конце цепи 1. Концентрацию гетеродимера XPC-RAD23B варьировали в интервале 1-25 нМ. Общий объем пробы составлял 10 мкл. Длина волны возбуждения составляла 482-16 нм, испускание наблюдалось на длине волны 530-40 нм.

При определении значений EC50 для связывания гетеродимера XPD-p44 с ДНК измерения проводили при комнатной температуре в буфере, содержащем 20 мМ HEPES рН 7.5, 30 мМ КСl, 5 мМ MgCl<sub>2</sub> и 1 мМ ТСЕР, в присутствии или отсутствии 2.5 мМ АТР, при постоянной концентрации 49-звенной одноцепочечной ДНК (10 нМ), несущей метку Cy3 на 3'-конце. Концентрацию белка варьировали от 5 до 1600 нМ. Общий объем пробы составлял 15 мкл. Длина волны возбуждения составляла 540-20 нм, испускание наблюдалось на длине волны 590-20 нм.

При сканировании для каждого образца проводилось по 50 вспышек, затем полученные значения усреднялись. По результатам титрования ДНК были построены стехиометрические кривые связывания. Экспериментальные данные аппроксимировали уравнением Хилла (1).

#### **2.2.4.6. Фотоаффинная модификация белка XPC с использованием аналогов субстратов *NER*.**

Реакционные смеси, содержащие 15 нМ радиоактивно меченую фотоактивируемую ДНК и 80 нМ рекомбинантный белковый комплекс XPC-RAD23B в буфере для фотоаффинной модификации 1 (25 мМ Трис-НСl pH 7.8, 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 25 мМ NaCl, 0.127 мМ β-меркаптоэтанол) инкубировали 15 минут при комнатной температуре, а затем облучали УФ-светом с длиной волны 312 нм при помощи прибора BioLink BLX «Vilber Lourmat», Франция. Облучение проводили в течение 10 минут при интенсивности света 1.5 Дж/см<sup>2</sup>\*мин. Если эксперимент требовал проведения бензоназной обработки продуктов модификации, сразу после завершения облучения часть реакционной смеси отбирали для анализа и смешивали ее с SDS-буфером для образцов. К оставшейся части добавляли бензоназу из расчета 0.1 ед. акт. на 1 мкл реакционной смеси и инкубировали 30 минут при 37°C. Реакцию останавливали добавлением буфера для подготовки образцов и нагреванием (15 мин, 95°C). Анализировали продукты реакции методом электрофореза по Леммли с последующей радиоавтографией как описано в разделе 2.2.2.3. Эффективность фотоаффинной модификации определяли как процент ДНК, включившейся в состав нуклеопротеиновых аддуктов.

#### **2.2.4.7. Фотоаффинная модификация белка XPD с использованием аналогов субстратов *NER*.**

Реакционные смеси для фотоаффинной модификации содержали 120-250 нМ ДНК-зонд и 200 нМ белок XPD в буфере для фотоаффинной модификации 2 (20 мМ HEPES pH 7.5, 50 мМ KCl, 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 1 мМ TCEP). Эксперименты были проведены как в присутствии 2.5 мМ АТР и 200 нМ белка р44, так и в их отсутствии. Далее образцы обрабатывали как описано в разделе 2.2.4.6.

#### **2.2.4.8. Определение эффективности расщепления AP-сайтов ферментом *APE1*.**

Для получения ДНК, содержащей AP-сайты, ДНК-дуплексы, несущие остатки дезоксиуридина, предварительно инкубировали с UDG (1 ед./мкл) в течение 15 мин при 37 С. Реакционную смесь, содержащую 10 нМ [<sup>32</sup>P]-меченую обработанную ферментом UDG ДНК, 2 нМ фермент APE1, а также буферные компоненты: 50 мМ трис-НСl (pH 7.5), 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 40 мМ NaCl, 1 мМ DTT и 0.25 мг/мл БСА, инкубировали в течение 1-10 мин при температуре 37°C. Реакцию останавливали добавлением 1/5 объема буфера для подготовки образцов к электрофоретическому анализу нуклеиновых кислот в денатурирующих условиях и прогревали в течение 5 мин при 95°C. Продукты реакции анализировали методом электрофоретического разделения в 20% ПААГ в денатурирующих условиях (2.2.2.2) с последующей радиоавтографией.

#### **2.2.4.9. Определение эффективности эксцизии модифицированного участка ДНК с использованием $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ -dCTP.**

Эффективность эксцизии фрагмента, содержащего модификацию, из модельных ДНК оценивали с применением методики постэксцизионного мечения [186]. Использовали протяженные (137 п.о.) нерадиоактивные ДНК-субстраты, содержащие объемное повреждение примерно в середине цепи. Схема методики представлена на рис. 9. Радиоактивную метку вводили с 3'-конца подвергшихся эксцизии из ДНК фрагментов, содержащих повреждение, в ходе ДНК-полимеразной реакции. ДНК-матрица, используемая для достройки продуктов эксцизии (ОДН-18), представляла собой ОДН, комплементарный поврежденному фрагменту ДНК. На ее 5'-конце расположено несколько последовательно включенных остатков гуанозинмонофосфата. В качестве контроля проводили достройку на неспецифической матрице (ОДН-19). В ходе определения активности 30 мкл смеси, содержащей модифицированный дуплекс (15-25 нМ), *NER*-компетентный клеточный экстракт и ДНК-матрицу (500 нМ) в буфере: 25 мМ Трис-НСl (рН 7.8), 45 мМ NaCl, 4.4 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0.02 мМ ЭДТА, 4 мМ АТФ – инкубировали 3-45 мин при 30°C. Реакцию останавливали прогреванием смеси при 95°C в течение 5 мин, после чего к реакционной смеси добавляли Таq-полимеразу (5 ед. активности), 10×Таq-буфер (50 мМ NaCl, 50 мМ Трис-НСl, рН 7.5, 1 мМ DTT, 0.1 мМ ЭДТА, 1% Triton X-100, 50% глицерина), смесь dATP, dTTP и dGTP (до концентрации 3.5 мкМ) и  $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ -dCTP (300 Бк), инкубировали 5 мин при 37°C, добавляли dCTP до концентрации 1.5 мкМ и инкубировали еще 15 мин. В реакционную смесь вносили раствор протеиназы К до 0.14 мкг/мл и SDS до 0.3% и инкубировали 30 мин при 37°C. Реакцию останавливали добавлением двух объемов 93%-ного этилового спирта. Продукты реакции разделяли методом электрофореза в денатурирующих условиях в 10% ПААГ (раздел 2.2.2.2).

#### **2.2.4.10. Статистическая обработка полученных данных.**

Для полученных данных определяли стандартное отклонение по формуле:

$$s = \sqrt{\frac{1}{n-1} \times \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \quad (2), \text{ где } n \text{ — объем выборки; } x_i \text{ — } i\text{-й элемент выборки; } \bar{x} \text{ — среднее арифметическое выборки.}$$

Планки погрешностей на всех рисунках представляют собой стандартные отклонения, полученные на основе по крайней мере трех независимых экспериментов.

## Глава 3. Результаты и их обсуждение.

### 3.1. Выбор модельных повреждений ДНК. Дизайн структур модельных ДНК-субстратов.

Первой задачей был выбор модельных повреждений, имитирующих различные типы природных повреждений ДНК, удаляемых в ходе репарации. В качестве объемных модельных повреждений мы использовали ненуклеотидные вставки nAnt и nFlu, и нуклеотиды, несущие фотоактивируемые остатки – Fab(5)-dCMP, Fab(g)-dCMP и Fap-dCMP, а также вставку на основе DEG. Структуры использованных модифицированных звеньев и их названия приведены на рис. 10.

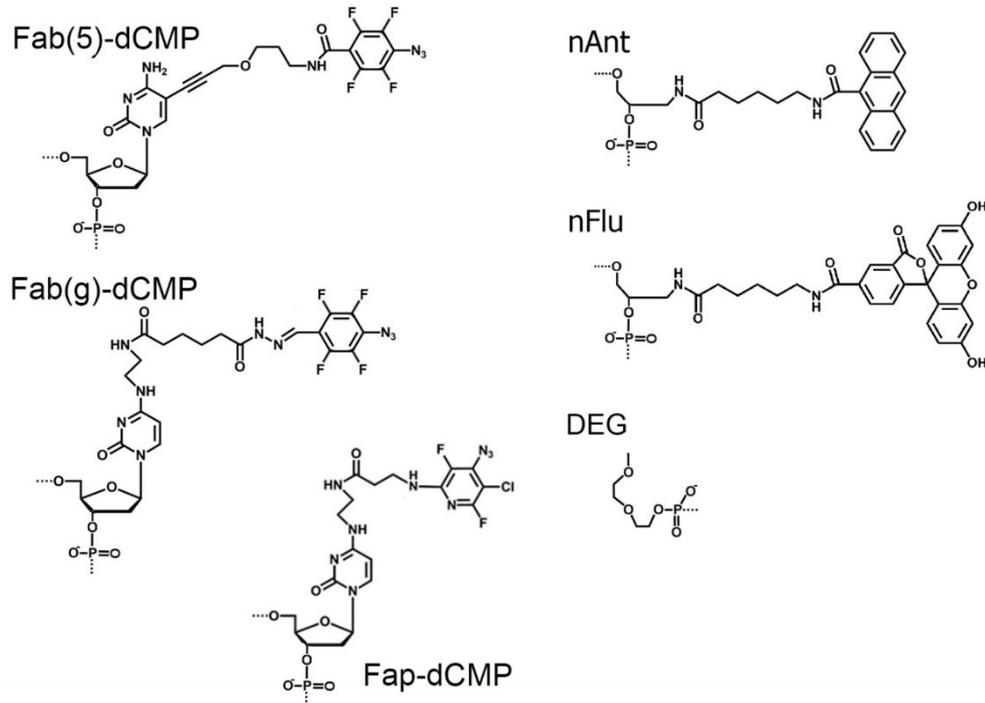


Рис. 10. Структуры модельных повреждений ДНК, использованных в работе.

Fab(5)-dCMP – 5-[3-(4-азидо-2,3,5,6-тетрафторбензамидо)пропоксипроп-1-инил]-2'-дезоксцитидин 3' фосфат;

Fab(g)-dCMP – экзо-N-[(4-азидотетрафторбензилиденгидразинокарбонил)-бутилкарбамоил]-2'-дезоксцитидин 3' фосфат;

Fap-dCMP – экзо-N-[2-[N-(4-азидо-2,5-дифторо-3-хлорпиридин-6-ил)-3-амино-пропионил]аминоэтил]-2'-дезоксцитидин 3' фосфат;

nAnt – ненуклеотидный фрагмент модифицированной цепи ДНК, содержащий N-[6-(9-антраценкарбамоил)гексаноил]-3-амино-1,2-пропандиол;

nFlu – ненуклеотидный фрагмент модифицированной цепи ДНК, содержащий (N-[6-(дипивалоил-5(6)-флуоресцеинилкарбамоил)гексаноил]-O1-(4,4'-диметокситритил)-O2-[(диизопропиламино)(2-цианоэтокси)фосфино]-3-амино-1,2-пропандиол);

DEG – вставка на основе фосфодиэфира диэтиленгликоля.

Повреждения ДНК, процессируемые системой NER, являются, как правило, объемными аддуктами, которые образуются при воздействии на азотистые основания УФ- и ионизирующего излучения, различных химических мутагенов, включая некоторые эндогенные метаболиты, а также некоторых химиотерапевтических агентов [55]. Для повреждений, эффективно распознаваемых и удаляемых в процессе NER, характерна значительная степень искажения структуры ДНК-дуплекса в месте их введения. В тоже время эта система репарации не проявляет жесткой специфичности к структуре повреждений, что позволяет ей удалять широчайший спектр повреждений ДНК. Это обстоятельство позволяет широко использовать искусственные синтетические структуры для изучения процесса NER.

nAnt и nFlu представляют собой вставки с объемным антраценовым (антрацетилкарбамоильным) или флуоресцеиновым (флуоресцеинкарбамоильным) заместителем, которые соединены с ДНК через гексаноильный линкер. Как было показано ранее, nAnt и nFlu в составе ДНК-дуплекса эффективно распознаются фактором XPC-RAD23B [90] и подвергаются эксцизии по механизму NER [186]. Природные повреждения схожей структуры (англ. “tethered lesions”) включают пиридилособутильные производные пуриновых и пиримидиновых азотистых оснований, некоторые из которых удаляются из ДНК системой NER [255,256]. Эти повреждения, наряду с производными бензо[а]пирена, возникают при реакции азотистых оснований с активными метаболитами табачного дыма.

Модельные повреждения Fab(5)-dC, Fab(g)-dC и Far-dU являются модифицированными азотистыми основаниями, содержащими фотореакционноспособную группировку. При воздействии УФ-излучения ДНК, содержащие фотоактивируемые объемные повреждения, способны ковалентно фиксировать контактирующие с ними белки [55,237,257,258]. Fab(5)-dC и Fab(g)-dC представляют собой модифицированные цитидины с объемными фторазибензоильными группировками, Far-dU – уридин с фторхлоразидопиридилальной группировкой. ДНК, содержащие модифицированные нуклеотидные звенья Fab(5)-dCMP, Fab(g)-dCMP и Far-dUMP, ранее были использованы в экспериментах по фотоаффинной модификации белков репарации [238,244,259]. В данной работе впервые оценено, насколько эффективно система NER осуществляет эксцизию этих модифицированных оснований из состава линейной протяженной двухцепочечной ДНК.

Как упоминалось выше, ряд модельных ДНК, использованных в работе, содержал в составе кластерного повреждения аналог AP-сайта. AP-сайты возникают в ДНК клетки с высокой частотой в результате спонтанного гидролиза N-гликозидной связи и как интермедиаты процесса эксцизионной репарации оснований. При физиологических условиях AP-сайты в составе ДНК существуют преимущественно в циклической фуранозной форме, а также могут принимать ациклическую форму – альдегида и гидратированного альдегида (рис. 7А). В ациклической форме AP-сайты проявляют большую химическую активность, подвергаясь спонтанной β-элиминации,

что осложняет проведение биохимических и структурных исследований [260]. Кроме того, при инкубации ДНК, содержащей AP-сайты, в клеточных экстрактах млекопитающих происходит их интенсивное ферментативное расщепление, преимущественно благодаря действию фермента APE1 [7,261,262]. Для того, чтобы избежать преждевременного распада субстратов во многих исследованиях используются аналоги AP-сайтов, обладающие большей химической стабильностью и/или менее чувствительные к действию фермента APE1 [7,261,262]. Примерами таких аналогов являются THF и DEG (рис. 7). Ранее в ЛБХФ было показано, что рекомбинантный фермент APE1 человека расщепляет цепи, содержащие остатки диэтиленгликоля (DEG) в составе ДНК-дуплексов по положению вставки, что позволяет рассматривать их как аналоги AP-сайтов [262,263]; эффективность их расщепления достаточно низкая и уменьшается в ряду: AP-сайт > THF > DEG [262–264]. Показано, что вставка DEG в составе двухцепочечного кластерного повреждения также достаточно устойчива к действию фермента APE1 и других нуклеаз в используемом в данной работе клеточном экстракте [265]. Вставка на основе фосфодиэфира диэтиленгликоля (DEG) была выбрана для замены AP-сайта в модельных ДНК, чтобы снизить уровень деградации ДНК эндогенным ферментом APE1 клеточных экстрактов.

При выборе аналога AP-сайта важным критерием было структурное сходство ДНК, содержащей природный AP-сайт и его аналог. Исследование структуры ДНК, содержащей AP-сайт, показало, что присутствие этого повреждения не изменяет ее В-форму, однако значительно дестабилизирует структуру ДНК-дуплекса в месте локализации повреждения [266]. Термодинамическая стабильность локального участка ДНК-дуплекса, содержащего AP-сайт, значительно варьирует в зависимости от контекста окружающей повреждение последовательности: как от нуклеотидов, окружающих AP-сайт, так и от расположенных напротив него в комплементарной цепи ДНК [266].

Известно, что наличие в ДНК повреждения может повышать гибкость двойной спирали или даже вызвать образование постоянного изгиба ДНК [267]. В ряде исследований было показано, что наличие AP-сайта в структуре ДНК повышает конформационную гибкость ДНК-дуплекса [268,269] и приводит к изгибу оси ДНК-дуплекса на угол  $\sim 30^\circ$  [270]. Особенности влияния структуры вставки DEG на конформационные характеристики ДНК-дуплексов были проанализированы в статье [271]; было показано, что введение одиночного диэтиленгликолевого остатка приводит к возникновению перегиба оси ДНК-дуплекса на угол  $20^\circ$ .

С использованием выбранных модельных повреждений были созданы структуры, имитирующие ДНК-субстраты, содержащие кластерные повреждения: набор линейных модифицированных двухцепочечных ДНК длиной 16, 54 и 137 п.о. Первый ряд ДНК содержал два объемных повреждения в составе кластера, второй – объемное повреждение и AP-сайт, расположенные в

комплементарных цепях ДНК-дуплекса. Модифицированные звенья располагались преимущественно по внутренним позициям цепей ДНК-дуплекса.

В качестве базовой последовательности ДНК был использован 137-звенный фрагмент плазмиды pBR322 (позиции 56–193 «верхней» цепи) [186]. Модельные повреждения вводились как в «верхнюю» (цепь 1) модельной ДНК, так и в «нижнюю» – цепь 2. Модифицированное звено цепи 1 во всех случаях располагалось в нулевой позиции – 68-ое звено от ее 5'-конца. Для введения повреждения nFlu или DEG в цепь 2 были выбраны определенные позиции: они располагались в пределах участка ДНК, комплементарного удаляемому в процессе NER поврежденному фрагменту из цепи 1. Таким образом, мы хотели проанализировать, как наличие дополнительного повреждения повлияет на работу репаративного белкового комплекса NER. В ДНК-дуплексах длиной 54 и 137 п.о. повреждение цепи 2 находилось в позициях, расположенных в районе 20-го нуклеотида со стороны 5'-конца – 10-го нуклеотида со стороны 3'-конца относительно повреждения цепи 1. Расположение модифицированных звеньев в цепи 2 в ДНК-дуплексах (137 п.о.) обозначалось следующими индексами: позиция 90-го звена от 5'-конца обозначалась как «-20», 80-го – «-10», 76-го – «-6», 73-го – как «-3», 66-го – «+4», 64-го – «+6», 62-го – «+8», 70-я позиция цепи 2 считалась нулевой. Структуры ДНК-дуплексов, содержащих кластерные повреждения, и их обозначения приведены в таблицах 3-6.

### **3.2. Исследование свойств ДНК, содержащих объемные повреждения в обеих цепях, как субстратов системы NER.**

#### **3.2.1. Оценка сродства фактора XPC-RAD23B к ДНК-дуплексам, содержащим объемные повреждения в обеих цепях.**

Оценка сродства фактора XPC-RAD23B к ДНК дает представление об эффективности первой стадии процесса NER – узнавания повреждения ДНК. В клетке фактор XPC-RAD23B постоянно сканирует геномную ДНК в поисках повреждений. При встрече с повреждением белок XPC не контактирует с аддуктом напрямую, а взаимодействует с ДНК вблизи повреждения, как с неповрежденной, так и с поврежденной цепью [57,77], дополнительно дестабилизируя ДНК-дуплекс в этом участке и изгибая его остов [79]. Фактор XPC функционирует в комплексе с белком RAD23B. Субъединица RAD23B стимулирует активность NER, а также защищает белок XPC от протеасомной деградации [63,64].

Сродство белкового комплекса XPC-RAD23B к 54-звенным ДНК-дуплексам, содержащим модельные повреждения Fab(5)-dC, nAnt и nFlu, определено методом торможения ДНК в геле. Повреждения Fab(5)-dC или nAnt располагались в цепи 1, цепь 2 содержала вставку nFlu в положениях -20, -10, -3, 0, +4 или +8 (структуры модельных ДНК приведены в таблице 3). Полученные

значения EC50 для связывания фактора ХРС-RAD23В с рядом модельных ДНК, содержащих объемные повреждения в обеих цепях, приведены в таблице 8.

Таблица 8. Значения EC50 для связывания фактора ХРС-RAD23В с ДНК-дуплексами, содержащими объемные повреждения в обеих цепях.

Обозначение ДНК-дуплекса (54 п.о.)	Значение EC50 для связывания фактора ХРС-RAD23В с ДНК, нМ (метод торможения ДНК в геле)
Fab(5)-dC/um	30.1 ± 1.6
Fab(5)-dC/nFlu-20	32.7 ± 3.4
Fab(5)-dC/nFlu-10	34.6 ± 6.2
Fab(5)-dC/nFlu-3	26.6 ± 0.4
Fab(5)-dC/nFlu <sub>0</sub>	25.0 ± 0.8
Fab(5)-dC/nFlu <sub>+4</sub>	25.6 ± 2.1
Fab(5)-dC/nFlu <sub>+8</sub>	21.3 ± 2.7
nAnt/um	24.3 ± 2.5
nAnt/nFlu-20	14.4 ± 3.7
nAnt/nFlu-10	14.0 ± 2.1
nAnt/nFlu <sub>0</sub>	13.3 ± 2.0
nAnt/nFlu <sub>+8</sub>	19.8 ± 2.3
ДНК um	44.7 ± 1.9

Значения сродства фактора ХРС-RAD23В ко всем ДНК, содержащим повреждения, были выше, чем к немодифицированной ДНК. Сродство комплекса ХРС-RAD23В к ДНК, содержащей nAnt как одиночное повреждение (ДНК nAnt/um), было на 25% выше, чем сродство к ДНК Fab(5)-dC/um (таблица 8).

Во всех проанализированных случаях появление второго объемного повреждения ДНК, вставки nFlu, в противоположной цепи ДНК-дуплекса приводило к увеличению сродства фактора ХРС-RAD23В к данной структуре (в 1.1-1.4 раза для ряда Fab(5)-dC-содержащих ДНК, содержащих близко расположенные повреждения в составе кластера, и 1.2-1.8 раз для ряда nAnt-содержащих ДНК). Величина, на которую изменялось значение сродства при появлении в ДНК второго повреждения (nFlu), зависела от типа повреждений и их взаимного расположения в ДНК-дуплексе. В ряду Fab(5)-dC-содержащих ДНК наблюдалось повышение сродства при смещении nFlu в сторону 5'-конца цепи 2 (ДНК Fab(5)-dC/nFlu<sub>0,+4,+8</sub>) – сродство белка ХРС к ДНК Fab(5)-dC/nFlu<sub>+8</sub> было в 1.2-1.5 раз выше, чем к остальным ДНК из этой серии, содержащим кластерные

повреждения. Взаимодействие фактора ХРС-RAD23В с рядом ДНК-дуплексов, содержащих nAnt в составе кластерного повреждения (ДНК nAnt/nFlu<sub>-20,-10,0,+8</sub>), во всех случаях характеризовалось более высоким сродством, чем его взаимодействие с рядом ДНК, содержащих Fab(5)-dC в составе кластера повреждений. При этом сродство фактора ХРС к ДНК nAnt/nFlu<sub>+8</sub>, в которой вставка nFlu была сдвинута в сторону 5'-конца цепи 2, было в 1.4-1.5 раза ниже по сравнению с остальными кластерными nAnt-содержащими ДНК. Таким образом, общей закономерности между взаимным расположением повреждений в рядах ДНК Fab(5)-dC/nFlu и nAnt/nFlu и сродством к ним фактора ХРС-RAD23В выявлено не было. Предположительно, сродство фактора ХРС-RAD23В к модельным ДНК зависело скорее не от расположения повреждений, а от расположения участков индуцированной ими локальной дестабилизации в молекулах ДНК-дуплексов.

Повышение концентрации фактора ХРС-RAD23В приводило к появлению нуклеопротеинового комплекса с меньшей электрофоретической подвижностью. Пример радиоавтографа геля после электрофоретического разделения комплексов, образовавшихся в результате связывания фактора ХРС-RAD23В с ДНК, приведен на рис. 11.

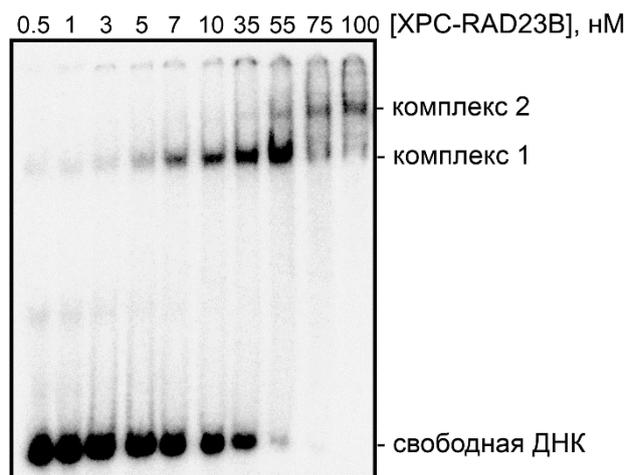


Рис. 11. Радиоавтограф ПААГ (5%) после разделения комплексов, образовавшихся в результате связывания фактора ХРС-RAD23В с ДНК. Реакционные смеси содержали 10 нМ ДНК Fab(5)-dC/um и фактор ХРС-RAD23В (его концентрацию варьировали в пределах 1-50 нМ) в буфере для связывания 1.

Наиболее вероятной причиной появления комплекса 2 является связывание второй молекулы белка ХРС с комплексом, образованным белком ХРС с ДНК. Ранее появление комплекса с меньшей электрофоретической подвижностью отмечалось в работе [77] при анализе взаимодействия фактора ХРС-RAD23В с модифицированной ДНК, содержащей остаток флуоресцеина, введенный в качестве заместителя по пятому положению дезоксиуридина.

Мы показали, что фактор ХРС-RAD23В проявляет более высокое сродство к ДНК, содержащим кластерное повреждение, по сравнению с ДНК, несущими одиночное модельное повреждение. Сродство белкового комплекса ХРС-RAD23В к ряду Fab(5)-dC/nFlu-содержащих ДНК оказалось ниже, чем к ряду ДНК-дуплексов, содержащих в обеих цепях ненуклеотидные модельные повреждения nAnt и nFlu. Наблюдаемое предпочтение фактора ХРС-RAD23В в связывании ДНК-дуплексов, содержащих вставку nFlu в составе кластерного повреждения, может обеспечиваться наличием в их структуре участков с повышенной дестабилизацией, возникающих в результате взаимодействия объемной флуоресцентильной группы nFlu с окружающими участками ДНК [90].

### **3.2.2. Фотоаффинная модификация гетеродимера ХРС-RAD23В с использованием зондов, имитирующих ДНК, содержащих кластерное повреждение.**

Для выявления структурных особенностей взаимодействия фактора ХРС-RAD23В с ДНК, содержащими кластерные повреждения, были проведены эксперименты по аффинной модификации этого белкового комплекса с использованием фотоактивируемых ДНК-зондов различной структуры. Метод фотоаффинной модификации широко используется при изучении структуры и динамики функционирования многокомпонентных белковых комплексов [237,238,244,272]. В качестве аффинных зондов для модификации белков NER, как правило, используются такие аналоги субстрата как радиоактивно меченые ДНК-дуплексы, содержащие во внутренней позиции одной из цепей ДНК объемную фотоактивируемую модификацию, распознаваемую белками системы NER как повреждение. В результате УФ-облучения реакционной смеси образуются радиоактивно меченые аддукты белков, контактирующих с фотоактивируемой группой, с ДНК.

Для экспериментов по аффинной модификации рекомбинантного гетеродимера ХРС-RAD23В были использованы ДНК-зонды (54 п.о.) трех типов, различающиеся расположением модельных повреждений: ДНК Fab(5)-dC/um, Fab(5)-dC/nFlu<sub>3</sub> и Fab(5)-dC/nFlu<sub>4</sub> (схемы ДНК-зондов приведены в таблице 3). При модификации белкового комплекса ХРС-RAD23В Fab(5)-dC-содержащие зонды образовывали аддукты с ДНК-связывающей субъединицей гетеродимера, 125-кДа ХРС, но не с 58-кДа белком RAD23В (рис. 12А). Ранее при использовании зондов, содержащих другие фотоактивируемые модельные повреждения, модификации субъединицы RAD23В данного комплекса также не наблюдалось [238]. Отсутствие продуктов фотоаффинной модификации белка RAD23В подтверждает то, что эта субъединица распознающего повреждение белкового комплекса NER не взаимодействует напрямую с поврежденной ДНК.

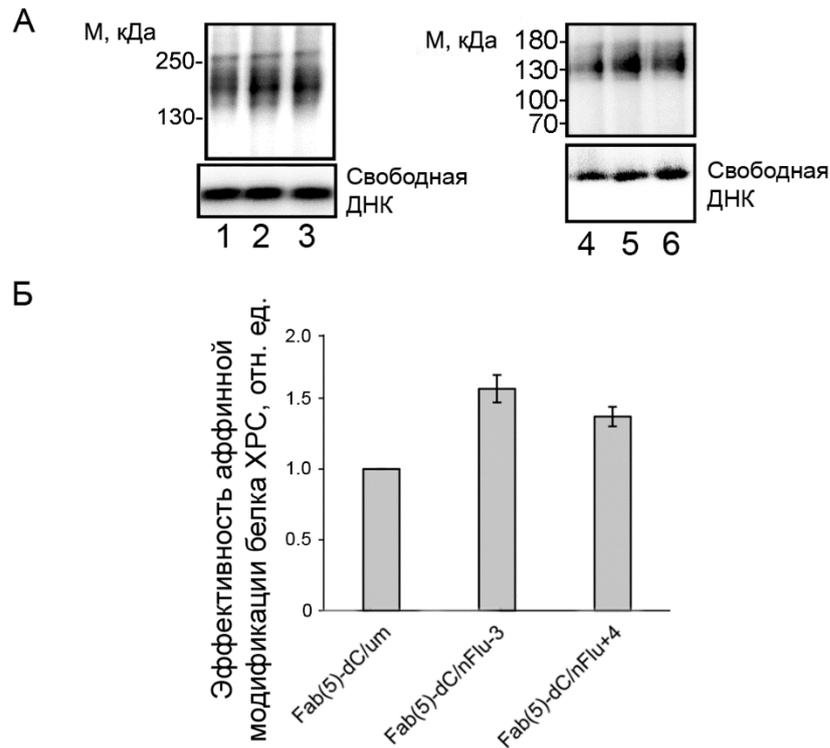


Рис. 12. (А). Радиоавтографы ПААГ после разделения продуктов фотоаффинной модификации рекомбинантного белкового комплекса ХРС-RAD23В ДНК-зондами. Реакционные смеси, содержащие 80 нМ фактор ХРС-RAD23В и 15 нМ ДНК Fab(5)-dC/um (дорожки 1, 4), Fab(5)-dC/nFlu+4 (дорожка 2, 5) или Fab(5)-dC/nFlu-3 (дорожка 3, 6) в буфере для фотоаффинной модификации 1, инкубировали при комнатной температуре в течение 15 мин. Затем реакционные смеси облучали УФ-светом с длиной волны 312 нм (прибор BioLink BLX Vilber Lourmat, Франция) в течение 10 мин при интенсивности 1.5 Дж/(см<sup>2</sup>\*мин). Часть образцов (А, дорожки 4-6) обрабатывали бензоназой (реакцию проводили в течение 30 мин при 37°C). (Б). Зависимость относительной эффективности фотоаффинной модификации рекомбинантного белка ХРС от типа используемого ДНК-зонда (до бензоназной обработки реакционных смесей). За единицу принята эффективность модификации белка ХРС с использованием ДНК Fab(5)-dC/um.

Эффективность мечения субъединицы ХРС была примерно в 1.5 раз выше при использовании ДНК-зондов, содержащих в комплементарной цепи ДНК-дуплекса вставку nFlu (рис. 12Б). Можно предположить, что изменения структуры ДНК-дуплексов, вызванные введением вставки nFlu в положения +4 или -3 комплементарной цепи, приводят к возникновению флуктуирующих участков дестабилизации ДНК (англ. “single strand characters”) вблизи модифицированного нуклеотида, содержащего фотоактивируемую группу. Таким образом, фактор ХРС-RAD23В более эффективно связывал ДНК-зонды, содержащие ненуклеотидную вставку nFlu, расположенную

как в направлении 5'-, так и 3'-конца комплементарной цепи ДНК-дуплекса относительно фотоактивируемого модельного повреждения Fab(5)-dC.

Фотоаффинная модификация белка ДНК-зондом существенно меняет его электрофоретическую подвижность. Наличие [<sup>32</sup>P]-метки вблизи фотоактивируемого повреждения дает возможность использовать бензоназную обработку реакционных смесей после проведения аффинной модификации для более точной оценки молекулярных масс белков-мишеней модификации. Бензоназа, являясь неспецифической эндонуклеазой, расщепляет ДНК, включенную в состав нуклеопротеинового аддукта, за исключением нуклеотидов, расположенных непосредственно вблизи места фотопрививки ДНК к белку. После такой обработки белки-мишени модификации остаются [<sup>32</sup>P]-мечеными, а их электрофоретическая подвижность оказывается равной или весьма близкой к подвижности соответствующих немодифицированных полипептидов [238]. Бензоназная обработка нуклеопротеиновых аддуктов показала, что молекулярная масса белка-мишени меченая составляет ~130 кДа, что соответствует молекулярной массе белка ХРС.

Мы показали, что при появлении в различных положениях комплементарной цепи Fab(5)-dC-содержащего ДНК-зонда дополнительного объемного повреждения, ненуклеотидной вставки nFlu, уровень формирования нуклеопротеиновых аддуктов повышался примерно в 1.5 раза. Полученные данные по фотоаффинной модификации фактора ХРС-RAD23В ДНК-зондами, содержащими объемные повреждения в обеих цепях, согласуются с результатами экспериментов по определению сродства этого белка к ДНК, содержащим кластерные повреждения (раздел 3.2.1).

### **3.2.3. Определение температуры плавления модельных ДНК.**

Нарушение спаривания азотистых оснований и дестабилизация регулярной структуры ДНК, вызываемые присутствием объемных аддуктов, играют ключевую роль в процессе NER, в особенности, на стадии первичного узнавания повреждения фактором ХРС-RAD23В. Влияние объемных повреждений ДНК, расположенных одиночно или в составе кластера, на термостабильность ДНК-дуплекса, было оценено методом термической денатурации с оптической регистрацией сигнала. Модельные 16-звенные ДНК содержали одиночное повреждение Fab(5)-dC или nAnt, или два объемных повреждения в обеих цепях ДНК-дуплекса с различным взаимным расположением (ДНК Fab(5)-dC/nFlu<sub>-3,0,+4</sub> и nAnt/nFlu<sub>-3,0,+4</sub>). Структуры ДНК-дуплексов приведены в таблице 4. Полученные значения температур плавления ДНК-дуплексов представлены в таблице 9, дифференциальные кривые плавления модельных ДНК – на рис. 13.

Таблица 9. Температуры плавления ДНК-дуплексов.

Название ДНК-дуплекса (16 п.о.)	Температура плавления ДНК-дуплекса, °С
ДНК um	68.2 ± 0.1
Fab(5)-dC/um	65.7 ± 0.2
Fab(5)-dC/nFlu <sub>-3</sub>	55.6 ± 0.2
Fab(5)-dC/nFlu <sub>0</sub>	54.9 ± 0.1
Fab(5)-dC/nFlu <sub>+4</sub>	58 ± 0.3
nAnt/um	59.6 ± 0.2 [90]
nAnt/nFlu <sub>-3...+4</sub>	–

Различие в температурах плавления ( $\Delta T_m$ ) Fab(5)-dC/um и немодифицированного ДНК-дуплекса составило 2.5°C. Полученная разница в температурах плавления относительно невысока: снижение температуры плавления ДНК-дуплекса, индуцированное присутствием повреждения Fab(5)-dC, в несколько раз ниже по сравнению с ранее проанализированными модельными повреждениями nAnt и nFlu, расположенными в той же нуклеотидной последовательности – 11.8±0.1 и 7.6±0.2°C соответственно [90]. Типичные повреждения, удаляемые системой NER – аддукты B[a]P, расположенные в центральном положении 11-звенного ДНК-дуплекса, снижают его температуру плавления на 13-20°C [236], а моно- и диаддукты производного аминифлуорена, помещенные в 16-звенные ДНК– на 4-13°C в зависимости от окружающей нуклеотидной последовательности [8,273].

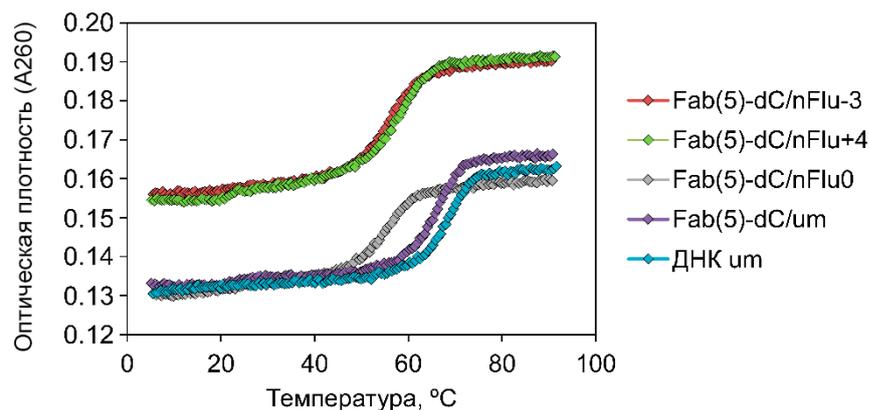


Рис. 13. Оценка термостабильности ДНК-дуплексов, содержащих кластерные повреждения, методом термической денатурации с оптической регистрацией сигнала. Образцы содержали 2.5 мкМ ДНК в 10 мМ какодилате натрия, pH 7.2.

Известно, что уровень локальной дестабилизации ДНК-дуплекса, индуцированной объемным повреждением, также как и эффективность процесса NER, значительно зависит от нуклеотидной последовательности, окружающей повреждение ДНК [8,273]. Для ряда субстратов NER

показано существование положительной корреляции между уровнем дестабилизации ДНК-дуплекса, индуцируемой повреждением, и эффективностью его распознавания фактором ХРС-RAD23В а также эффективностью эксцизии, катализируемой системой NER [87]. Однако,  $\Delta T_m$  не всегда оказывается пропорциональна эффективности эксцизии повреждения из ДНК системой NER [8,90]. Например, несмотря на то, что повреждение Fab-dC снижает  $T_m$  ДНК-дуплекса на  $8.1 \pm 0.2^\circ\text{C}$  и эффективно распознается фактором ХРС-RAD23В в составе ДНК, оно является нерепарируемым в процессе NER [90]. Представляло интерес проведение сравнительной оценки эффективности эксцизии фрагментов ДНК, содержащих повреждения Fab(5)-dC, nAnt и Flu, комплексом белков системы NER.

Далее были оценены значения  $\Delta T_m$  для ДНК-дуплексов, содержащих кластерные повреждения. ДНК-дуплексы, содержащие в цепи 1 вставку nAnt, а в комплементарной цепи – nFlu в позициях -3, 0 и +4 (16-nAnt/nFlu<sub>-3...+4</sub>) стабильных ДНК-дуплексов в условиях эксперимента не формировали, что указывает на высокий уровень дестабилизации их структуры. Введение вставки nFlu в комплементарную цепь Fab(5)-dC-содержащего ДНК-дуплекса снижало его температуру плавления на  $10.2-13.3^\circ\text{C}$  в зависимости от взаимного расположения повреждений. Появление в ДНК-дуплексе такого ненуклеотидного повреждения ДНК как nAnt или nFlu приводит к заведомому нарушению канонического спаривания оснований по меньшей мере в одной нуклеотидной паре. Ожидаемо, два ненуклеотидных модельных повреждения (nAnt и nFlu), расположенные в комплементарных цепях ДНК, индуцировали более значительную дестабилизацию структуры ДНК-дуплекса, чем ненуклеотидное и нуклеотидное повреждение (Fab(5)-dC и nFlu).

Таким образом, для ДНК-дуплекса, содержащего одиночное модельное повреждение Fab(5)-dC, характерен в целом более низкий уровень локальной дестабилизации, чем для ранее проанализированных ДНК, содержащих ненуклеотидные модельные повреждения, и для некоторых типичных субстратов NER. ДНК-дуплексы, содержащие Fab(5)-dC и nFlu в обеих цепях характеризуются значительно более низким уровнем термостабильности по сравнению с ДНК Fab(5)-dC/um. Взаимное расположение повреждений Fab(5)-dC и nFlu в составе кластера не оказывает значительного влияния на уровне термостабильности ДНК-дуплексов.

### **3.2.4. Оценка эффективности эксцизии повреждения ДНК системой NER в присутствии в комплементарной цепи ДНК-дуплекса второго объемного повреждения.**

Следующей задачей была оценка эффективности эксцизии повреждений из ДНК-дуплексов, обе цепи которых содержат объемные аддукты, системой NER. В данной серии экспериментов было использовано три модельных объемных повреждения: Fab(5)-dC, nAnt и nFlu. Каждое из этих повреждений при одиночном расположении эффективно удаляется системой NER из протяженных ДНК-дуплексов [186,274]. Были созданы ДНК, содержащие Fab(5)-dC или nAnt в цепи

1, и второе объемное повреждение ДНК, вставку nFlu, в положениях -20, -10, -3, 0, +4 или +8 комплементарной ей цепи 2. Структуры модельных ДНК (137 п.о.) приведены в таблице 3.

Мы показали, что ряд проанализированных ДНК, содержащих две близко расположенные объемные модификации в составе кластерного повреждения, становятся практически нерепарируемыми в процессе NER (рис. 14).

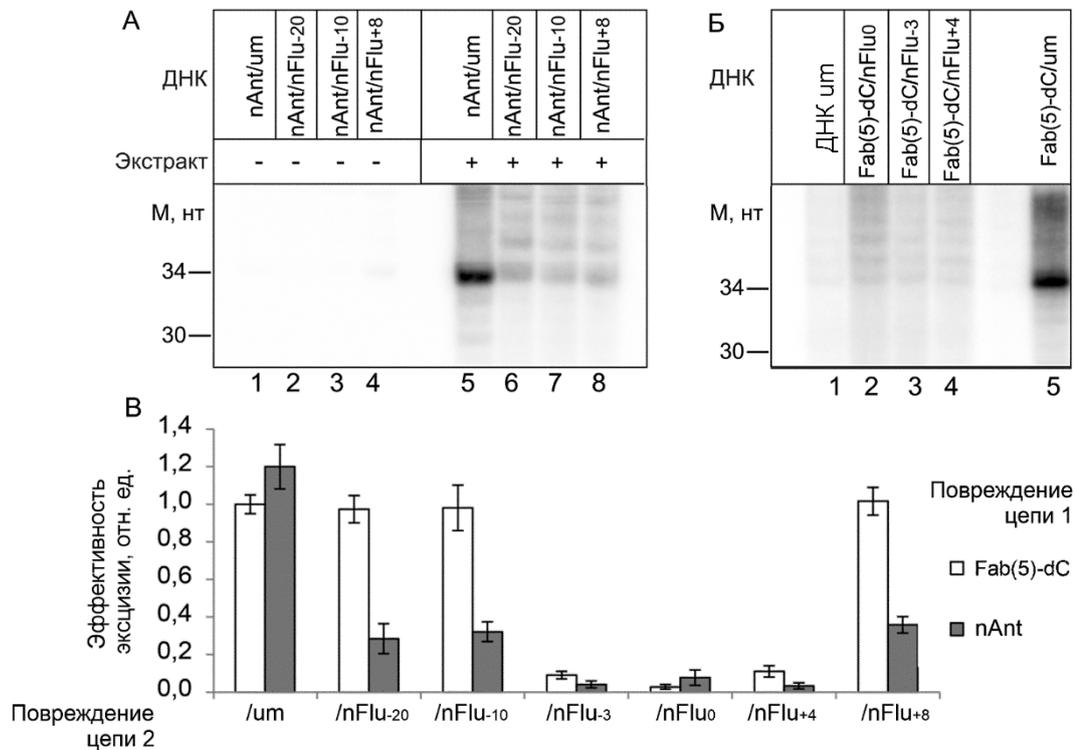


Рис. 14. (А), (Б). Радиоавтографы ПААГ (10%) после разделения продуктов реакции NER *in vitro*. 20 нМ nAnt- (А) или Fab(5)-dC-содержащая (Б) модельная ДНК (137 п.о.), 3.5 мг/мл белков экстракта печени кролика, 500 нМ специфическая матрица в 1×NER-буфере (45 мин при 30°C). Длины ОДН, использованных в качестве маркеров, указаны слева. (В). Относительные эффективности эксцизии Fab(5)-dC- и nAnt- содержащих фрагментов из состава ДНК-дуплексов. Эффективность эксцизии Fab(5)-dC-содержащего фрагмента из ДНК Fab(5)-dC/um была принята за единицу.

Уровень катализируемой системой NER эксцизии nAnt- и Fab(5)-dC-содержащих фрагментов из 137-звенных ДНК, содержащих два повреждения, расположенных на расстоянии до 4 нт (ДНК nAnt/nFlu-3...+4 и Fab(5)-dC/nFlu-3...+4), был очень низким – менее 5-10% от уровня эксцизии из ДНК nAnt/um и Fab(5)-dC/um соответственно (рис. 14). При расположении в более удаленных позициях цепи 2 (-20, -10 или +8) повреждение nFlu по-разному влияло на эффективность эксцизии фрагментов ДНК, содержащих nAnt или Fab(5)-dC, системой NER. Уровень эксцизии Fab(5)-dC-содержащего фрагмента из цепи 1 значительно повышался при увеличении расстояния

между объемными повреждениями ДНК: эксцизия повреждения Fab(5)-dC из ДНК Fab(5)-dC/um и Fab(5)-dC/nFlu<sub>-20,-10,+8</sub> происходила одинаково эффективно. При этом эффективность эксцизии nAnt-содержащих фрагментов из ДНК, несущих два повреждения, разделенных 8-20 п.о. (ДНК nAnt/nFlu<sub>-20,-10,+8</sub>), не превышала 20% от эффективности эксцизии из ДНК nAnt/um системой NER.

Повышенное сродство фактора XPC-RAD23B к ДНК-дуплексам, содержащим две объемные модификации (раздел 3.2.1, таблица 8), и свойственная им пониженная термостабильность (раздел 3.2.3, таблица 9) указывают на наличие в ДНК Fab(5)-dC/nFlu и nAnt/nFlu участков дестабилизации. Также об их наличии свидетельствует показанная с помощью метода фотоаффинной модификации более высокая эффективность взаимодействия ДНК-зондов Fab(5)-dC/nFlu<sub>+4</sub> и Fab(5)-dC/nFlu<sub>-3</sub> с рекомбинантным белковым комплексом XPC-RAD23B по сравнению с ДНК Fab(5)-dC/um (раздел 3.2.2, рис. 12). Для исследованных ДНК-дуплексов, содержащих объемные повреждения Fab(5)-dC и nFlu или nAnt и nFlu в обеих цепях, в большинстве случаев наблюдалась обратная зависимость между сродством фактора XPC к данным ДНК и эффективностью эксцизии повреждения цепи 1 системой NER. Комплексы, образованные белком XPC с ДНК, оказывались непродуктивными и не приводили к эксцизии Fab(5)-dC и nAnt из состава кластерного повреждения ДНК.

Повышенная термическая стабильность модифицированного ДНК-дуплекса может быть ассоциирована с подавленной эксцизией повреждения ДНК, катализируемой системой NER [7,86]. Например, несмотря на то, что наличие в ДНК-дуплексе объемного аддукта-производного В[а]Р, как правило, снижает его термическую стабильность [236], при помещении данного повреждения в определенную неканоническую последовательность ДНК (замене комплементарного основания напротив аддукта В[а]Р на AP-сайт или на сайт делеции) термостабильность такого ДНК-дуплекса может оказаться повышенной по сравнению немодифицированной ДНК. В результате при распознавании такого повреждения фактором XPC процессы «выворачивания» оснований из спирали ДНК, а также инсерции β-шпильки XPC оказываются затруднены, а эксцизия В[а]Р-содержащего фрагмента системой NER – подавленной [7]. Таким образом, при замене нуклеотида, расположенного напротив аддукта В[а]Р-dG, на AP-сайт повышенная стабильность прилегающих участков ДНК снижает эффективность его эксцизии. Однако, в работе [8] продемонстрирован противоположный пример – при репарации ДНК, содержащих моно- и ди-аддукты ацетаминифлуорена показана обратная зависимость между уровнем термостабильности ДНК-дуплекса, который менялся в зависимости от типа удаляемого повреждения ДНК и окружающей нуклеотидной последовательности, и эффективностью процесса NER.

В данном исследовании значения термостабильности ДНК-дуплексов, содержащих кластерные повреждения, находились в обратной корреляции с эффективностью процесса NER. Известно, что детали структурной организации ДНК-субстратов, в частности, то, как участки дестабилизации расположены относительно повреждения ДНК, оказывают существенное влияние на эффективность их эксцизии из ДНК системой NER [7,8,90]. Термодинамические свойства поврежденного участка ДНК в свою очередь зависят от химической структуры повреждения (включая его стереохимию, топологию и физический размер), а также от окружающей последовательности ДНК [76,230]. Структура модельных повреждений влияет на такие характеристики как протяженность и расположение участков ДНК с ослабленной или, напротив, стабилизированной структурой в ДНК-дуплексе. Для объяснения картины подавления репарации необходимо обратиться к данным, полученным методом моделирования молекулярной динамики ДНК. Особенностью исследуемых нами модельных повреждений ДНК nAnt и nFlu является их ненуклеотидная природа. Появление каждого из них в ДНК приводит к появлению как минимум одной пары звеньев, в которой заведомо отсутствуют классические комплементарные взаимодействия. При этом данные повреждения специфически распознаются и подвергаются эксцизии, катализируемой системой NER. Выполненный в работе [90] анализ структурных основ распознавания подобных повреждений ДНК системой NER с привлечением компьютерного моделирования показал, что наличие в структуре повреждения подвижного протяженного спейсера позволяет объемной группировке контактировать с прилегающими к повреждению участками ДНК. Мы предполагаем, что появление дополнительных участков дестабилизации в ДНК-дуплексе, индуцированных присутствием объемных повреждений в обеих его цепях, затрудняет правильную ориентацию фактора ХРС на ДНК, что приводит к подавлению эксцизии повреждений системой NER.

Мы показали, что эффективно распознаваемые объемные повреждения, присутствующие в обеих цепях ДНК и находящиеся на небольшом удалении друг от друга (в данном случае – в пределах одного витка спирали ДНК), создают препятствия для работы системы NER, причем величина интервала, в пределах которого наблюдается подавление эксцизии, зависит от структуры удаляемого объемного повреждения ДНК. Для ряда проанализированных кластерных модельных ДНК выявлена обратная корреляция между способностью к распознаванию поврежденного участка ДНК фактором ХРС-RAD23B и эффективностью эксцизии поврежденного фрагмента, катализируемой системой NER. Повышенное сродство фактора ХРС к ДНК-дуплексам, содержащим две объемные модификации, и свойственная им пониженная термостабильность указывают на наличие в ДНК Fab(5)-dC/nFlu и nAnt/nFlu дестабилизированных участков. Появление таких участков в ДНК-дуплексах может быть обусловлено наличием в структуре использованных модельных повреждений подвижных протяженных спейсеров, позволяющих объем-

ным группировкам контактировать с прилегающими к повреждению участками ДНК, что приводит к неправильной ориентации фактора ХРС на ДНК-субстрате. В результате этого комплексы, которые белок ХРС образует с ДНК, содержащими кластерные повреждения, оказываются непродуктивными и не приводят к эксцизии объемного повреждения ДНК системой NER.

### **3.3. Исследование свойств ДНК-дуплексов, содержащих объемную вставку и аналог AP-сайта в составе кластерного повреждения, как субстратов системы NER.**

#### **3.3.1. Оценка сродства фактора ХРС-RAD23В к ДНК-дуплексам, содержащим объемную вставку и аналог AP-сайта в составе кластерного повреждения.**

Характеризацию свойств модельных ДНК, содержащих кластерное повреждение, состоящее из объемной ненуклеотидной вставки nFlu и аналога AP-сайта – DEG, начали с определения сродства к ним фактора ХРС-RAD23В, инициирующего процесс NER. Значения сродства определяли с использованием метода, основанного на измерении анизотропии флуоресценции. Анизотропией флуоресценции называют явление, заключающееся в различной интенсивности света, испускаемого флуорофором вдоль различных осей поляризации. Измерение анизотропии флуоресценции позволяет детектировать связывание белков и их диссоциацию из комплексов с флуоресцентно меченой ДНК в реальном времени и ранее использовалось для исследования взаимодействия белков репарации с аналогами субстрата NER [116,275,276].

ДНК, используемые для этих экспериментов, содержали флуоресцентную репортерную группировку (FAM), находящуюся на 5'-конце одной из цепей ДНК-дуплекса. Схемы с расположением модельных повреждений в ДНК представлены в таблице 3.

Полученные данные были использованы для расчета величин EC50. Расчеты проводились с учетом концентрации активного белка, определенной по методике, описанной ранее [244]. Увеличение концентрации белка не изменяло интенсивность флуоресценции, что упростило последующие вычисления. Значения EC50 для комплексов фактора ХРС с модельными ДНК представлены в таблице 10.

Таблица 10. Значения EC50 для комплексов фактора XPC-RAD23B с ДНК, содержащими объемное ненуклеотидное повреждение и аналог AP-сайта в составе кластера.

Обозначение ДНК-дуплекса (54 п.о., 5'-FAM меченый)	Значения EC50 для комплексов белка XPC с ДНК, нМ (по измерению анизотропии флуоресценции)
nFlu/um	3.2±0.3
nFlu/DEG-20	3.1±0.3
nFlu/DEG-10	3.0±0.4
nFlu/DEG-6	2.7±0.4
nFlu/DEG-3	2.2±0.3
nFlu/DEG <sub>0</sub>	1.7±0.2
nFlu/DEG <sub>+4</sub>	2.0±0.2
nFlu/DEG <sub>+6</sub>	2.1±0.2
nFlu/DEG <sub>+8</sub>	3.0±0.3
DEG/um	4.6±0.4
ДНК um	7.4±0.8

Появление в немодифицированном ДНК-дуплексе одиночного повреждения (nFlu или DEG) довольно значительно повышало сродство к нему фактора XPC-RAD23B: примерно в 2.3 раза для ДНК nFlu/um и в 1.4 раза – для ДНК DEG/um. Значения EC50 для комплексов белка XPC с ДНК, содержащими кластерные повреждения, менялись в диапазоне 1.7-3.1 нМ (таблица 10). Эффективность распознавания фактором XPC-RAD23B модельных ДНК, содержащих повреждения в составе кластера, варьировала в зависимости от их взаимного расположения, однако значительных изменений ни для одной структуры выявлено не было. В ряду кластерных модельных ДНК увеличение сродства фактора XPC-RAD23B было более значительным при расположении DEG напротив nFlu (в 1.9 раз выше, чем к ДНК, содержащей одиночную вставку nFlu), или его смещении на 4-6 нуклеотидов в «+ сторону» – к 5'-концу цепи 2 ДНК-дуплекса. По мере отдаления позиции DEG от позиции nFlu сродство фактора XPC к ДНК nFlu/DEG приближалось к значению для ДНК nFlu/um. Кривые титрования некоторых ДНК гетеродимером XPC-RAD23B представлены на рис. 15 как зависимости относительных значений анизотропии от концентрации белка.

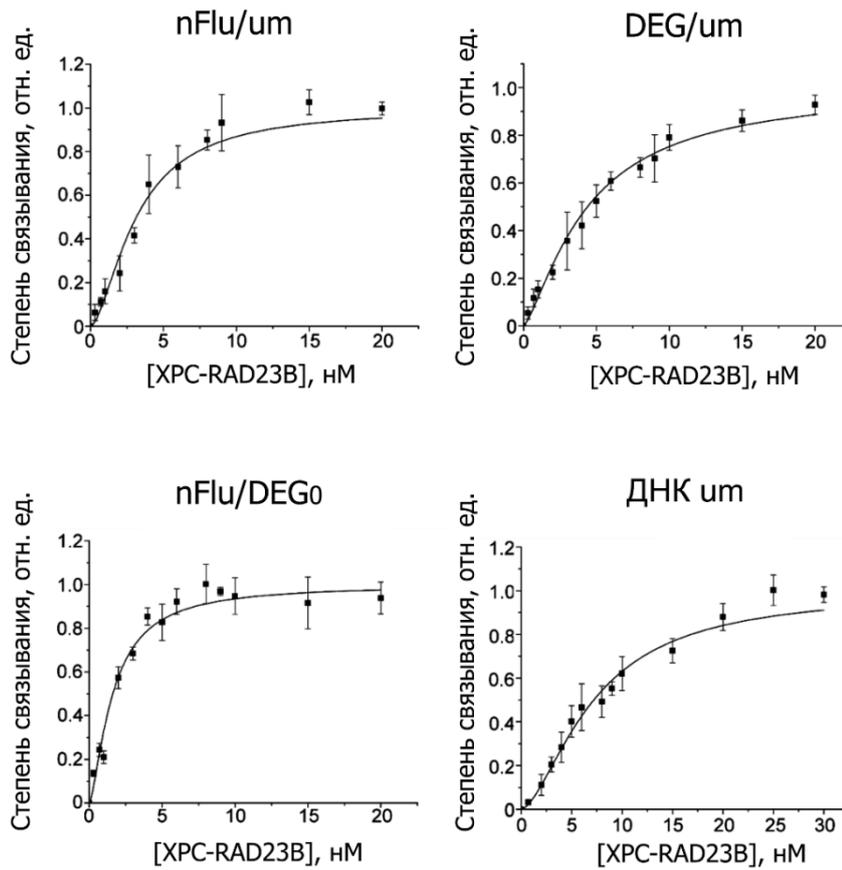


Рис. 15. Кривые титрования связывания гетеродимера XPC-RAD23B с ДНК-дуплексами (5 нМ) nFlu/um, ДНК DEG/um, ДНК nFlu/DEG<sub>0</sub> и ДНК um. Концентрации белка приведены с учетом его ДНК-связывающей активности.

Процесс узнавания фактором XPC участков с нарушенной структурой ДНК-дуплекса не включает непосредственного контакта белка-сенсора с повреждением ДНК, однако структурные и стереохимические свойства повреждений могут влиять на продуктивность образующихся комплексов [230]. Распределение локальных участков дестабилизации в ДНК-дуплексах, содержащих кластерные повреждения, зависит от типа и расположения повреждений в его структуре и определяет различия в величинах сродства к ним фактора XPC-RAD23B. В целом, закономерность, выявленная для серии ДНК nFlu/DEG, близка к той, что наблюдалась для ДНК, содержащих кластеры, состоящие из двух объемных повреждений, в которых ароматические циклические группировки связаны с остовом линкерными фрагментами (раздел 3.2.1).

### 3.3.2. Определение величин изгиба оси ДНК-дуплексов, содержащих аналог AP-сайта (DEG) и объемное повреждение (nFlu).

Следующей задачей была оценка величин углов изгиба осей ДНК-дуплексов, содержащих nFlu или DEG для получения информации о структурных особенностях исследуемых ДНК-дуплексов. Фактор ХРС-RAD23В, осуществляющий первичное узнавание повреждения ДНК, чувствителен к нарушениям регулярной структуры двойной спирали и предпочтительно взаимодействует участками дц ДНК, содержащими локальные искажения [55,84]. К таким искажениям относятся ослабленные или нарушенные водородные связи, изгибы спирали ДНК, вывернутые основания в неповрежденной цепи ДНК [68,87]. Присутствие в составе ДНК-дуплекса объемных повреждений, AP-сайтов, нуклеотидов без комплементарной пары (выпетливания), мисматчей и ОЦР вносит в структуру ДНК-дуплекса структурные искажения, которые могут приводить к формированию постоянного изгиба двойной спирали ДНК на этом. Для ряда объемных модификаций ДНК, химиотерапевтических агентов – производных цисплатина, было обнаружено наличие корреляции между степенью дестабилизации ДНК-дуплекса и степенью отклонения его структуры от линейной формы [277,278], похожая зависимость была обнаружена и для ряда ненуклеотидных модификаций ДНК [279].

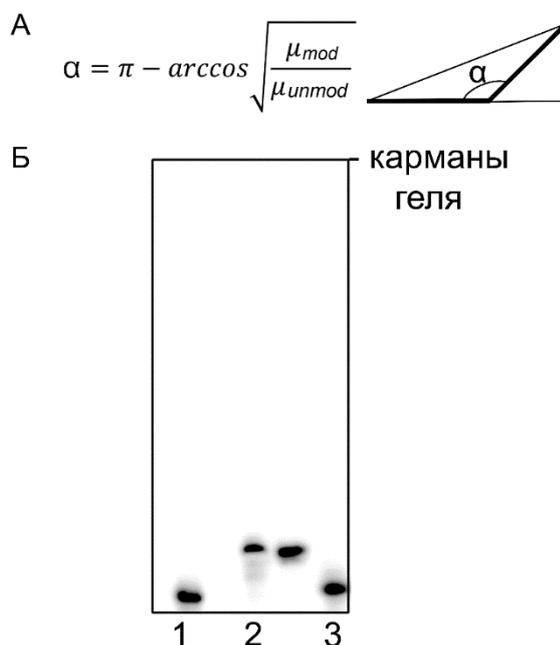


Рис. 16. (А). Формула, по которой были определены величины углов изгибов оси ДНК-дуплексов, где  $\mu_{mod}$  и  $\mu_{unmod}$  – электрофоретические подвижности дуплексов при электрофорезе в неденатурирующем 10%-ном ПААГ при 4°C. (Б). Радиоавтограф ПААГ (10%) после разделения 16-звенных ДНК um (дорожка 1), ДНК nFlu/um (дорожка 2) и ДНК DEG/um (дорожка 3).

Мы показали, что угол изгиба оси ДНК-дуплекса, содержащего одиночную вставку на основе фосфодиэфира диэтиленгликоля, DEG, составляет  $173^\circ$  (рис. 16Б, таблица 11). Угол изгиба ДНК в районе повреждения определяли по формуле, приведенной на рис. 16А [280]. Ранее в работе [271] было показано, что одиночная вставка DEG индуцирует изгиб ДНК-дуплекса в  $160^\circ$ . Известно, что величина угла изгиба ДНК-дуплекса, индуцированного различными модификациями ДНК, значительно варьирует в зависимости от окружающей нуклеотидной последовательности [281,282]. Разница в полученных значениях может быть связана с различиями как в окружающем ДНК-контексте, так и в методике проведения эксперимента. Угол изгиба, индуцированный введением в ДНК-дуплекс повреждения nFlu, эффективно репарируемого системой NER [186], составляет  $165^\circ$ . Согласно литературным данным, такие значения углов изгиба спирали в целом характерны для ДНК-дуплексов, содержащих репарируемые системой NER объемные аддукты: повреждения, вызванные УФ-излучением [283], аддукты производных цисплатина [284] и бенз-[а]пирена [227].

Таблица 11. Углы изгибов оси ДНК-дуплексов, индуцированные повреждением.

Название ДНК-дуплекса (16 п.о.)	Угол изгиба, $^\circ$
nFlu/um	$165 \pm 2$
DEG/um	$173 \pm 2$

Поскольку оба проанализированных повреждения индуцируют изгибание оси ДНК-дуплекса, в случае их расположения в составе двухцепочечного кластера возможен компенсирующий эффект двух этих модификаций, приводящий к уменьшению угла изгиба дуплекса. Представляла интерес оценка величины угла изгиба оси кластерного ДНК-дуплекса, а также определение того, с какой эффективностью объемная вставка nFlu и DEG, расположенные как одиночно, так и в составе кластерного повреждения ДНК, будут процессироваться белками репарации систем NER.

### 3.3.3. Оценка эффективности инцизии AP-сайта, расположенного в составе кластерного повреждения ДНК с объемной вставкой nFlu, ферментом APE1.

В контексте данной работы представляла интерес сравнительная оценка эффективности инцизии цепи ДНК-дуплекса, содержащей AP-сайт, ферментом APE1 при наличии в различных положениях комплементарной цепи объемного повреждения nFlu. Остаток фосфодиэфира диэтиленгликоля, DEG, является аналогом AP-сайта – повреждения ДНК, которое расщепляется в клетке под действием APE1 в процессе удаления по механизму BER. Согласно общепринятой точке зрения, при одновременном удалении повреждений в составе кластера, располагающихся

в противоположных цепях ДНК-дуплекса, значительно повышается риск образования двухцепочечных разрывов ДНК, которые являются потенциально летальными для клетки [14,16,159]. Однако в работе [160] показано, что основная часть кластерных повреждений ДНК не конвертируются в ДЦР в клетках млекопитающих, что может указывать на существование механизмов, позволяющих избежать накопления опасных интермедиатов репарации. Считается, что при репарации кластерных повреждений ДНК, состоящих из объемного аддукта и AP-сайта, наиболее благоприятным сценарием для клетки является их последовательное удаление: сначала системой BER осуществляется процессинг AP-сайта, затем происходит эксцизия объемного повреждения ДНК системой NER [7,203,285,286]. Как правило, инцизия одиночного AP-сайта по механизму BER происходит быстрее, чем эксцизия объемного повреждения системой NER [7].

В данной работе были созданы модельные ДНК-дуплексы, в состав которых входила вставка nFlu и AP-сайт с различным взаимным расположением данных повреждений: ДНК AP/um, AP/nFlu<sub>-3</sub>, AP/nFlu<sub>0</sub> и AP/nFlu<sub>+4</sub> (таблица 5). Значительной разницы между ДНК AP/um, AP/nFlu<sub>0</sub> и AP/nFlu<sub>+4</sub> в эффективности инцизии содержащих AP-сайт цепей ДНК, катализируемого ферментом APE1, не наблюдалось (рис. 17):

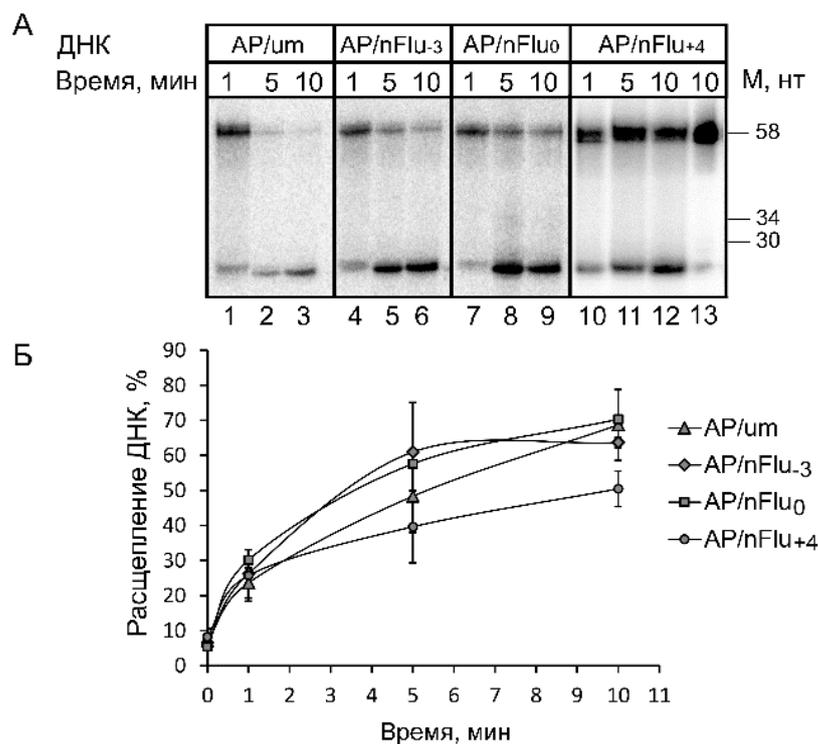


Рис. 17. (А). Радиоавтографы ПААГ (20%) после разделения продуктов инцизии ДНК, катализируемого APE1. Реакционные смеси, содержащие 10 нМ ДНК, 2 нМ APE1 и буферные компоненты, инкубировали в течение 1-10 мин при температуре 37°C. Контрольную реакцию инцизии, не содержащую APE1 (дорожка 13), инкубировали в течение 10 мин. Длины ОДН, использованных в качестве маркеров, указаны справа. (Б). Зависимость эффективности инцизии содержащих AP-сайт цепей ДНК, катализируемой APE1, от расположения вставки nFlu в ДНК.

При 5 минутах инкубации APE1 с субстратом расщепленным оказывалось от 54% (ДНК AP/um) до 70% (ДНК AP/nFlu<sub>3</sub>) цепей ДНК, содержащих AP-сайт. Инцизия AP-сайта в ДНК AP/nFlu<sub>4</sub> происходила менее эффективно (41% при 5 мин инкубации с APE1) по сравнению с другими ДНК-дуплексами (рис. 17). Таким образом, в изучаемых нами кластерных структурах процесс BER может быть инициирован и AP-сайт – конвертирован в ОЦР.

Проведенное ранее исследование репарации модельных ДНК, содержащих аналог AP-сайта (ТНФ) и цис- или транс-стереоизомер производного В[a]P-dG в составе двухцепочечного кластерного повреждения (рис. 8Б), показало, что активность системы NER полностью подавляется при замене канонического основания dC напротив аддукта В[a]P-dG на AP-сайт [7]. Эндонуклеаза APE1 сохраняет способность к осуществлению инцизии AP-сайта при наличии В[a]P-dG аддукта в комплементарной цепи, однако ее эффективность может снижаться в зависимости от конформации аддукта В[a]P-dG и от взаимного расположения данных повреждений ДНК [21,225]. AP-сайты, расположенные прямо напротив модифицированного dG или смещенные в 5'-направлении, гидролизуются APE1 с эффективностью, умеренно меньшей, чем одиночно расположенный AP-сайт, тогда как AP-сайты, смещенные в 3'-направлении – значительно менее эффективно [21]. Похожий эффект был обнаружен при репарации множественных AP-сайтов [155,287,288]: эффективность инцизии AP-сайта APE1 значительно снижалась в присутствии в противоположной цепи ДНК-дуплекса второго AP-сайта либо ОЦР, смещенного в 3'-направлении относительно «первого» AP-сайта [155]. Однако при расположении напротив AP-сайта других окислительных повреждений ДНК выраженного подавления его инцизии, катализируемой APE1, выявлено не было [155]. Согласно результатам моделирования молекулярной динамики процесса взаимодействия фермента APE1 человека с ДНК, содержащей AP-сайт в составе кластерного повреждения, дестабилизация ДНК-дуплекса, индуцированная специфическим взаимодействием повреждений в данном участке дц ДНК, значительно уменьшает активность эндонуклеазы APE1 [21,288].

Мы показали, что AP-сайты, расположенные с объемной вставкой nFlu в составе двухцепочечного кластерного повреждения ДНК в пределах 4 п.о., эффективно подвергаются инцизии ферментом APE1. Таким образом, процессинг AP-сайта, входящего в состав кластерного повреждения ДНК соответствующей структуры, по механизму BER может быть инициирован.

### 3.3.4. Определение эффективности эксцизии объемного повреждения ДНК системой NER при наличии в комплементарной цепи ДНК-дуплекса аналога AP-сайта.

Целью следующего эксперимента было изучение влияния присутствия в противоположной цепи ДНК-дуплекса вставки на основе DEG на эффективность эксцизии объемного повреждения nFlu системой NER. Структуры модельных повреждений ДНК представлены на рис. 10, их расположение в модельных ДНК приведено в таблице 3.

Показано, что в присутствии вставки на основе DEG в позициях -3, 0, +4 комплементарной цепи ДНК-дуплекса эксцизия повреждения nFlu системой NER полностью подавлена (рис. 18), а в позициях +6 и -6 – снижена на 50-60% по сравнению с уровнем эксцизии nFlu из ДНК nFlu/um (рис. 18А, В).

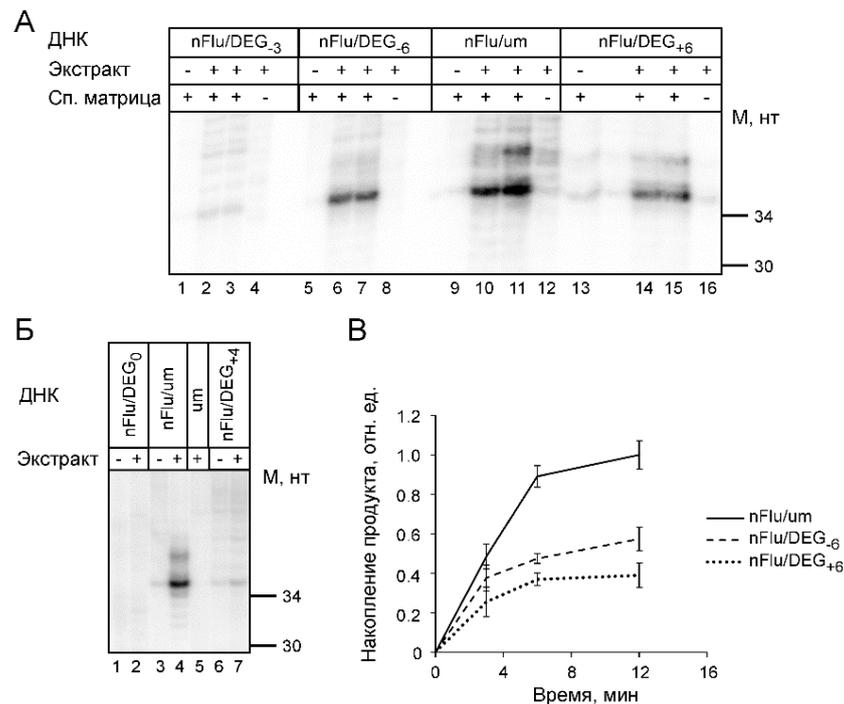


Рис. 18. (А). Радиоавтограф ПААГ (10%) после разделения продуктов реакции NER *in vitro*. Реакционные смеси, содержащие 20 нМ ДНК nFlu/DEG (137 п.о.), 1.2 мг/мл белков экстракта клеток CHO, 500 нМ матрицу в 1×NER-буфере инкубировали в течение 6 или 12 мин (Б) при 30°C. Длины ОДН, использованных в качестве маркеров, указаны справа. (Б). Реакционные смеси, содержащие 20 нМ ДНК nFlu/DEG (137 п.о.), 1.2 мг/мл белков экстракта клеток CHO и специфическую матрицу в 1×NER-буфере инкубировали в течение 12 мин при 30°C. (В). Относительные эффективности эксцизии nFlu-содержащих фрагментов из ДНК-дуплексов. При расчетах эффективность эксцизии nFlu-содержащего фрагмента из ДНК nFlu/um, инкубированной с белками экстракта клеток CHO в течение 12 мин, была принята за единицу.

Появление в немодифицированной цепи nFlu-содержащего ДНК-дуплекса вставки DEG, удаленной более чем на 6 нуклеотидных звеньев от nFlu (позиции -20, -10, +8 комплементарной цепи ДНК), практически не изменяло его свойства как субстрата NER: сродство фактора XPC-RAD23В к этим ДНК (раздел 3.3.1, таблица 10) и эффективность эксцизии фрагмента ДНК, содержащего nFlu, были близки к значениям, характерным для ДНК nFlu/um. Выдерживание неповрежденной ДНК с белками клеточного экстракта не приводило к появлению специфических продуктов эксцизии, катализируемой системой NER (рис. 18Б).

При этом сродство фактора XPC к ряду ДНК, содержащих близко расположенные повреждения nFlu и DEG в противоположных цепях ДНК-дуплекса (позиции DEG -6...+6), во всех проанализированных случаях было в 1.2-1.9 раз выше по сравнению с ДНК nFlu/um (раздел 3.3.1, таблица 10) и находилось в обратной зависимости от эффективности эксцизии nFlu из таких кластерных модельных ДНК (рис. 19).

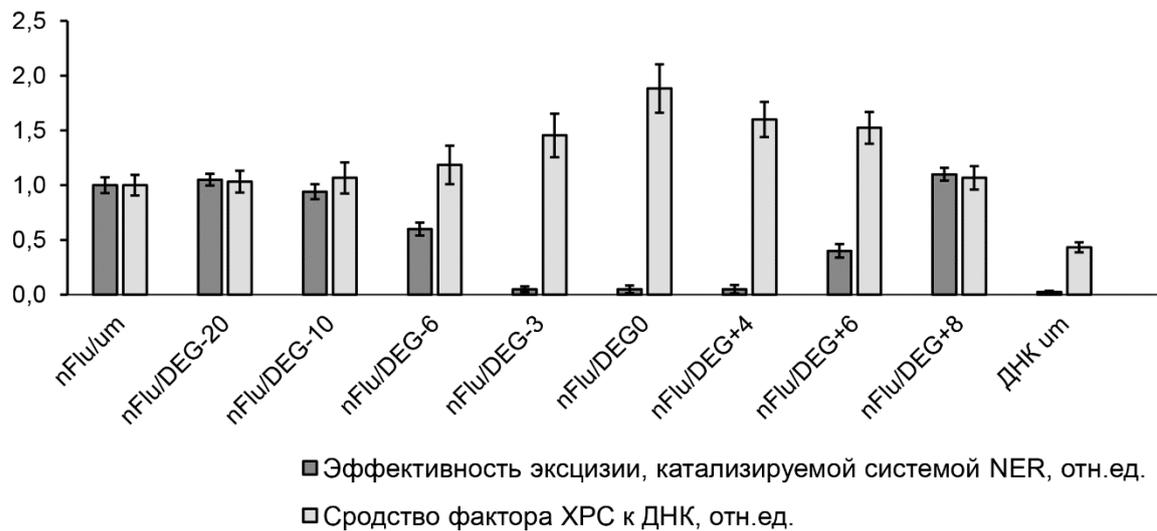


Рис. 19. Сравнение эффективности эксцизии, катализируемой системой NER, и сродства фактора XPC-RAD23В к поврежденным ДНК-дуплексам. За единицу был принят уровень эксцизии nFlu из ДНК nFlu/um (137 п.о.) при ее инкубации с белками клеточного экстракта СНО в течение 12 мин, а также уровень сродства (значение, обратно пропорциональное величине EC50) фактора XPC-RAD23В к соответствующей 54-звенной ДНК.

Таким образом, для проанализированных ДНК, содержащих разделенные менее 6 п.о. повреждения nFlu и DEG, большая стабильность комплексов белка XPC с модельными ДНК может быть ассоциирована с менее эффективной эксцизией повреждения nFlu системой NER. Ранее отсутствие прямой корреляции между уровнем сродства белка XPC к ДНК и эффективностью эксцизии объемного повреждения системой NER выявлено в ряде других работ при изучении

свойств ДНК с изолированными [90,229], а также кластерными повреждениями [7,8,86]. Расположение DEG и nFlu в противоположных позициях ДНК-дуплекса, как и аналогичная локализация повреждений THF (аналога AP-сайта) и аддукта B[a]P, полностью подавляло эксцизию объемного повреждения из ДНК [7,289]. Ранее мы показали (раздел 3.2), что для исследованной нами серии ДНК, содержащих кластерные объемные повреждения Fab(5)-dC, nAnt и nFlu, структура которых содержит протяженный спейсер, соединяющий объемную модификацию с ДНК, характерна обратная корреляция между эффективностью их эксцизии системой NER и эффективностью их связывания фактором XPC. Следует отметить, что по «дальности» эффективного влияния присутствия на уровень эксцизии объемного повреждения nFlu из кластеров DEG был ближе к Fab(5)-dC, содержащему линкер с жесткой структурой, ограничивающей взаимодействия ароматической фторазидобензоильной группировки с азотистыми основаниями близко расположенных нуклеотидов [289].

Полученные результаты указывают на то, что фактор XPC формирует непродуктивные комплексы с ДНК, в которых повреждения nFlu и DEG, расположенные в составе двухцепочечного кластера, разделяет менее шести пар нуклеотидных звеньев. Согласно существующей модели, в процессе первичного узнавания фактор XPC не контактирует с повреждением непосредственно, узнавая скорее нарушения регулярной структуры ДНК, приводящие к образованию так называемых флуктуирующих «одноцепочечных участков» (“single strand characters”) [55], однако структура повреждения также может влиять на продуктивность образующихся комплексов фактора XPC с ДНК [230].

При распознавании повреждения белок XPC взаимодействует с достаточно протяженным участком ДНК. Исследования кристаллической структуры комплекса белкового продукта дрожжевого ортолога гена XPC с ДНК, содержащей вызванное УФ-излучением повреждение, показало, что этот белок формирует продуктивные комплексы с ДНК с участием  $\beta$ -шпилек трех доменов: специфическая инсерция в ДНК шпильки VHD3 происходит в месте повреждения, с 3'-стороны от повреждения с ДНК специфически взаимодействует шпилька VHD2, неспецифическое взаимодействие шпильки VHD1 с участком ДНК протяженностью примерно 10 нт происходит в области связывания транскриптазного домена белка XPC [57,290].

Изменение структуры ДНК при появлении повреждения может препятствовать продуктивному связыванию фактора XPC. Низкая эффективность процесса NER, наблюдающаяся при расположении повреждения в определенном ДНК-контексте, может быть связана с увеличением локальной стабильности структуры ДНК за счет стэкинг-взаимодействий между повреждением и окружающими основаниями ДНК [7,81]. Ранее в работе [7] при исследовании свойств аддуктов B[a]P было продемонстрировано, что при отсутствии комплементарного звена напротив азоти-

стого основания (в том числе AP-сайта напротив В[а]Р) сильные стэкинг-взаимодействия ароматических колец объемного повреждения с основаниями соседних с поврежденным звеньев ДНК противоположной цепи могут мешать формированию комплекса белка ХРС с ДНК, препятствуя извлечению соседних оснований из спирали ДНК для взаимодействия с ароматическими остатками белка, а также инсерции  $\beta$ -шпильки и «выворачиванию» из спирали повреждения, подавляя протекание процесса NER. Таким образом, повышенная стабильность прилегающих к объемному повреждению участков ДНК может приводить к уменьшению эффективности эксцизии повреждения ДНК. Однако наличие комплементарного звена или основания в звене напротив объемного повреждения не является абсолютно необходимым условием для успешной инициации процесса NER, а степень подавления эксцизии зависит от структуры повреждения ДНК [76,81,86].

Мы предположили, что существование обратной корреляции между сродством фактора ХРС-RAD23В к ДНК nFlu/DEG<sub>-6...+6</sub> и эффективностью эксцизии из них nFlu связано с изменениями в структуре ДНК-дуплексов, для выявления которых требовалось применение дополнительных способов анализа их структуры. Выбранное в качестве дополнительной опции привлечение данных компьютерного моделирования помогло понять характер этих изменений [265].

На основании экспериментальных данных выбраны модельные ДНК, содержащие кластерные повреждения, эффективность эксцизии nFlu системой NER из которых значительно различалась. Было проведено моделирование МД (молекулярной динамики) ДНК-дуплексов, содержащих nFlu как единственное повреждение (напротив nFlu располагалось азотистое основание dG) или в составе ДНК nFlu/DEG<sub>0</sub> и ДНК nFlu/DEG<sub>+6</sub> (напротив DEG располагался дезокситимидин), а также немодифицированного ДНК-дуплекса [265].

Согласно полученным результатам, проанализированные ДНК-дуплексы (54 п.о.) сохраняют В-форму на всем протяжении МД траектории за исключением участков, содержащих повреждение. ДНК *im* не проявляет значимых особенностей структуры. Вдоль всей траектории наблюдается возможность изгиба оси в разных областях спирали ДНК, однако его величины и частота возникновения существенно ниже, чем у модифицированных ДНК-дуплексов (рис. 20А).

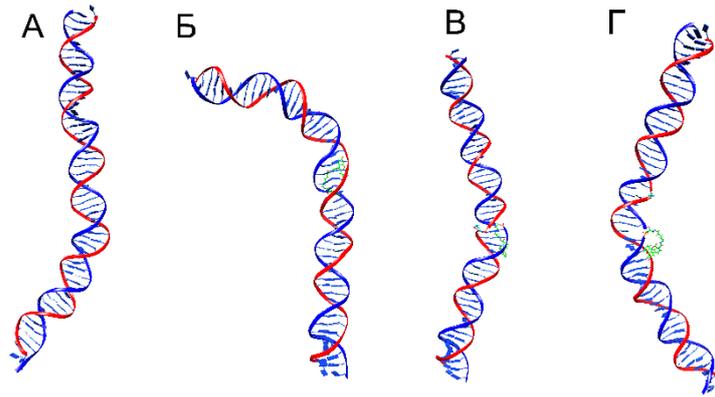


Рис. 20. Структуры ДНК-дуплексов с максимальным углом изгиба ДНК, наблюдаемые в МД траектории. (А). ДНК um. (Б). ДНК nFlu/um. (В). ДНК nFlu/DEG<sub>0</sub>. (Г). ДНК nFlu/DEG<sub>+6</sub>.

При моделировании ДНК-дуплекса с одиночным объемным повреждением ДНК nFlu/um наблюдалась динамика возникновений/исчезновений изгиба в области повреждения на достаточно большой угол  $\sim 45^\circ$  (рис. 20Б). Для области расположения модификации nFlu и соседних с ней оснований в ДНК-дуплексе nFlu/um, а также в ДНК nFlu/DEG<sub>0</sub> характерна повышенная конформационная подвижность. Кроме того, возможен выход dG, находящегося в комплементарной цепи напротив nFlu, из стэкинга с соседними парами оснований. Типичные варианты расположения остатка флуоресцеина в составе ДНК nFlu/um, наблюдающаяся вдоль МД траектории, приведены на рис. 21.

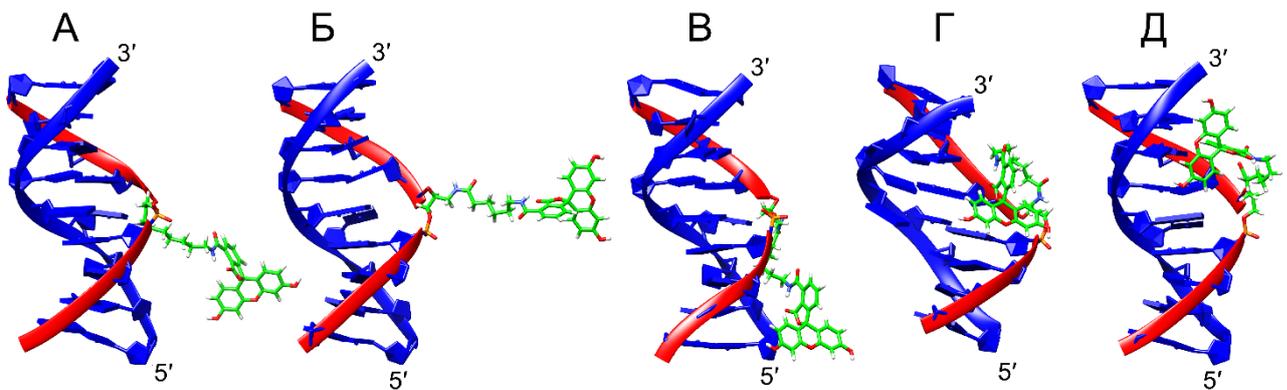


Рис. 21. Типичные варианты расположения остатка флуоресцеина в составе ДНК nFlu/um вдоль МД траектории. Цепь 1 обозначена красным цветом, цепь 2 - синим.

Благодаря наличию в структуре nFlu гибкого линкера расположение флуоресцеинового фрагмента может быть различным. В основном Flu располагается в области большой бороздки, ненадолго перемещаясь в малую бороздку и ориентируясь в сторону 5'-конца содержащей nFlu цепи, однако некоторое время может находиться и в стороне от двойной спирали. Моделирование выявило возможность нарушения водородных связей в паре dG/dC, прилегающей к nFlu с 5'-стороны. С изменением расположения флуоресцеинового фрагмента может меняться величина угла

изгиба оси спирали дц ДНК, индуцируемого присутствием повреждения. Ранее анализ структуры ДНК, содержащих повреждения Far-dC, nAnt и Flu-dU, выполненный с применением компьютерного моделирования, показал, что наличие подвижного протяженного линкера позволяет объемной ароматической группировке контактировать с прилегающими к повреждению участками ДНК, изменяя их структуру и стабильность. Характер изменений (дестабилизирующий или стабилизирующий), а также расположение этих участков относительно повреждения ДНК, влияют на эффективность эксцизии повреждения системой NER [90]. Моделирование ДНК, содержащей nFlu в качестве единственного повреждения, показало, что наличие в структуре nFlu гибкого линкера позволяет флуоресцеиновому фрагменту менять расположение на ДНК, образуя различные структуры, в том числе и оптимальные для формирования продуктивных комплексов с фактором ХРС. Кроме того, сейчас мы с уверенностью можем полагать, что существенный вклад в эксцизию nFlu вносит этап его верификации, о чем свидетельствует высокое сродство геликазы XPD к ДНК, содержащей nFlu [251].

Согласно результатам моделирования, в ДНК nFlu/DEG<sub>0</sub> на протяжении всей МД траектории сохраняется стэкинг смежных с nFlu азотистых оснований, и двойная спираль в месте введения повреждения ДНК находится в «схлопнутом» состоянии. Кроме того, в ДНК nFlu/DEG<sub>0</sub> фрагмент флуоресцеина (nFlu) в течение небольшой части времени траектории (~30-50 нс из 500 нс) взаимодействует с DEG на противоположной стороне спирали (Рис. 22Г).

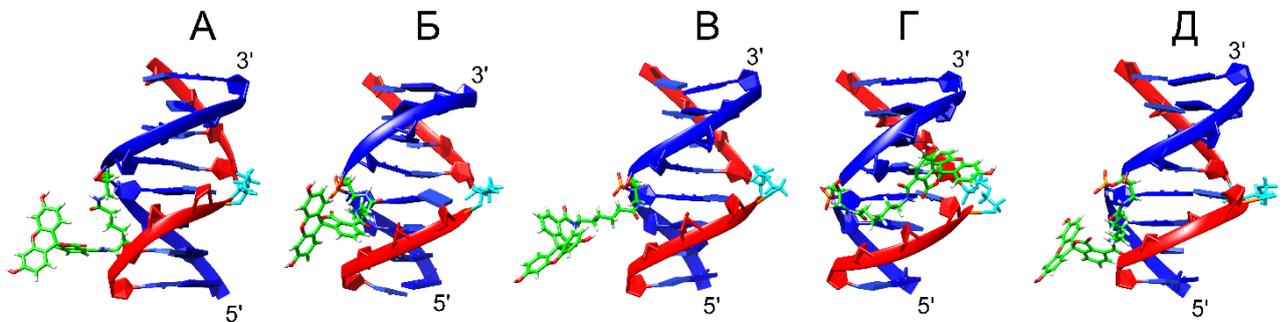


Рис. 22. Типичные варианты расположения остатка флуоресцеина в составе ДНК nFlu/DEG<sub>0</sub> вдоль МД траектории. Цепь 1 обозначена синим цветом, цепь 2 - красным.

Такое расположение повреждений ДНК может стерически затруднять связывание фактора ХРС с поврежденным участком ДНК. Также в ДНК nFlu/DEG<sub>0</sub> присутствуют участки с высокой подвижностью цепей, удаленные от места введения вставки nFlu [265]. Эти области могут служить мишенями для связывания фактора ХРС; таким образом, часть комплексов, образуемых фактором ХРС с этой ДНК, может располагаться в участках, не содержащих nFlu. При этом образуются как продуктивные (в месте введения nFlu) и «потенциально продуктивные» комплексы (с 5' стороны от повреждения), так и заведомо непродуктивные комплексы – при расположении

белка ХРС с 3' от nFlu [84,90]. Мы предполагаем, что «схлопнутое» состояние двойной спирали в месте введения повреждения в сочетании с возможностью образования непродуктивных комплексов ХРС-ДНК с удаленными от места введения nFlu участками молекулами, и прямого взаимодействия между повреждениями, образующими кластер, приводят к полному подавлению эксцизии nFlu из ДНК nFlu/DEG<sub>0</sub>.

В дуплексе ДНК nFlu/DEG<sub>+6</sub> остаток флуоресцеина расположен в малой бороздке и ориентирован в сторону 5'-конца цепи 1, при этом имеет две типичные ориентации – либо всеми тремя циклами ориентирован к основаниям в малой бороздке (рис. 23А), либо часть циклов обращена наружу (рис. 23Б, В, Г). Такое положение может быть дополнительно стабилизировано водородными связями внутри линкера, связывающего Flu с остовом цепи ДНК, или водородными связями, которые этот линкер образует с ДНК. Конформация ДНК в области введения nFlu (позиции «-2» – «+2») сохраняется. ДНК nFlu/DEG<sub>+6</sub> характеризуется довольно умеренной величиной угла изгиба, что объясняется компенсирующим действием повреждений, расположенных в комплементарных цепях дуплекса, каждая из которых способна перегибать ДНК [90,289,291] (3.3.2, таблица 11).

Наблюдаемая более низкая конформационная подвижность, характерная для ДНК nFlu/DEG<sub>+6</sub>, может указывать на присутствие в данном ДНК-дуплексе области с повышенной стабильностью и жесткостью структуры [265]. Эти структурные особенности могут препятствовать раскрытию ДНК фактором ХРС и снижать вероятность образования продуктивных комплексов ХРС-ДНК, и, как следствие, эффективность эксцизии, катализируемой системой NER [7,86].

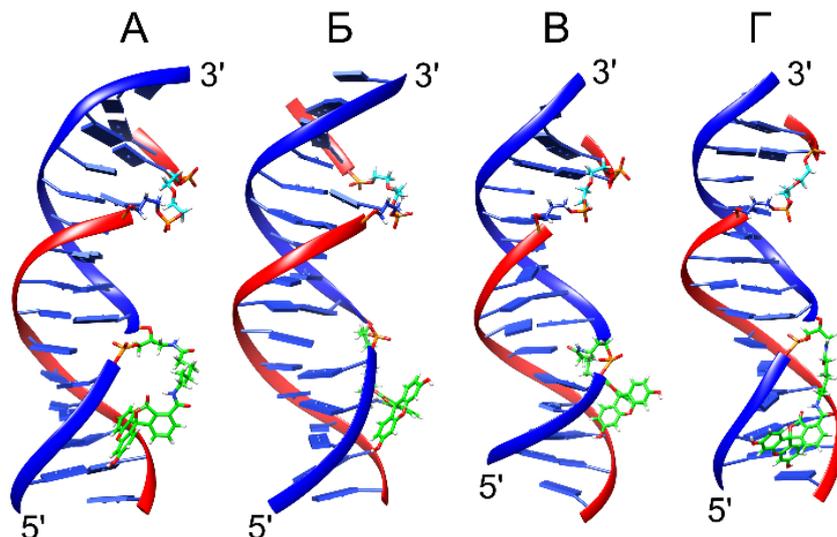


Рис. 23. Типичные варианты расположения остатка флуоресцеина в составе ДНК nFlu/DEG<sub>+6</sub> вдоль МД траектории. Цепь 1 обозначена синим цветом, цепь 2 - красным.

Таким образом, на примере расположенных в обеих цепях кластерных повреждений ДНК, сконструированных с использованием nFlu и DEG, мы показали, что появление такого окислительного повреждения, как AP-сайт в пределах одного витка спирали ДНК создает препятствия для работы системы NER. Фактор XPC проявляет повышенное сродство к ДНК, содержащим близко расположенные повреждения в составе кластера, за счет дополнительных искажений в их регулярной структуре. Мы предположили, что устойчивость к эксцизии по механизму NER повреждения nFlu, расположенного в составе кластерного повреждения с аналогом AP-сайта, возникает из-за специфических структурных особенностей поврежденного участка ДНК, препятствующих его продуктивному распознаванию фактором XPC-RAD23B. Неспецифическое связывание фактора XPC с соседними областями дц ДНК и возможность взаимодействия между повреждениями в составе кластера дополнительно затрудняет образование продуктивного для NER комплекса белка XPC с областью, содержащей объемное повреждение. Таким образом, взаимодействие фактора XPC-RAD23B с ДНК, содержащими кластерные повреждения, является ключевым этапом, определяющим сниженную эффективность эксцизии объемного повреждения из их структуры системой NER. Полученные результаты позволяют лучше понять структурные основы наблюдаемого подавления процесса NER при репарации кластерных повреждений ДНК.

Одновременная эксцизия повреждений, образующих двухцепочечный кластер, может приводить к образованию в ДНК ДЦР [16,17,157–159]. На примере кластерных повреждений ДНК, состоящих из объемного аддукта nFlu и аналога AP-сайта, расположенных в пределах 4 п.о., мы показали, что AP-сайт расщепляется ферментом APE1 достаточно эффективно (раздел 3.3.3), в то время как эксцизия объемного повреждения комплексом белков системы NER из таких структур затруднена. Можно предположить, что такой механизм удаления повреждений имеет адаптивное значение, поскольку позволяет избежать одновременной инициации процессов репарации по путям NER и BER, таким образом, снижает риск образования ДЦР в клеточной ДНК.

### 3.4. Исследование взаимодействия комплекса субъединиц XPD-p44 фактора TFIIH с ДНК, несущими модельные повреждения.

#### 3.4.1. Сравнительная оценка эффективности эксцизии фотоактивируемых модельных повреждений ДНК системой NER.

Для того, чтобы исследовать взаимодействие комплекса субъединиц XPD-p44 фактора TFIIH, осуществляющего стадию верификации повреждения ДНК в процессе NER, с фотоактивируемыми повреждениями, требовался ряд модельных повреждений с известными эффективностями эксцизии из ДНК-дуплекса системой NER. В данной работе впервые оценена эффективность эксцизии модифицированных пиримидиновых нуклеотидов, несущих объемные фотоактивируемые фрагменты, – Fab(5)-dC, Fab(g)-dC и Far-dU системой NER из линейной протяженной дц ДНК. Ранее было показано, что ненуклеотидные синтетические объемные повреждения nAnt и nFlu эффективно подвергаются эксцизии в процессе NER [186].

Мы использовали ДНК nAnt/um и nFlu/um в качестве положительного контроля для оценки эффективности эксцизии фотоактивируемых модельных повреждений из ДНК-дуплексов. В качестве отрицательного контроля была использована ДНК (137 п.о.), не содержащая модификаций. Была создана серия 137-звенных ДНК, содержащих объемные повреждения Fab(5)-dC, Fab(g)-dC, nAnt, nFlu или Far-dU. Структуры использованных модифицированных нуклеотидов представлены на рис. 10. Эффективность эксцизии повреждений из полученных ДНК системой NER оценена методом постэксцизионного мечения [186]; модельные ДНК-дуплексы инкубировали с белками NER-компетентного экстракта клеток CHO (рис. 24).

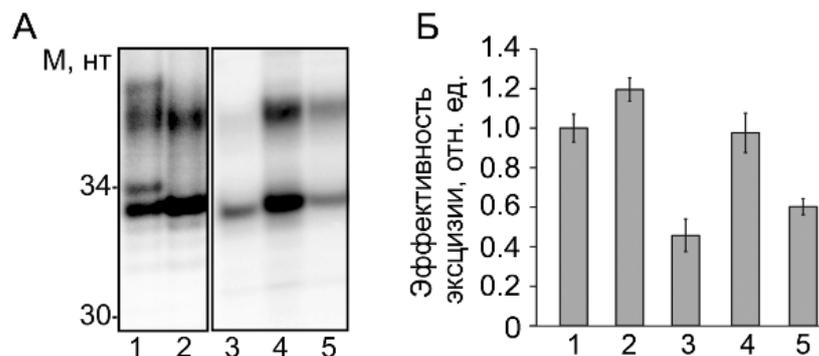


Рис. 24. (А). Радиоавтограф ПААГ (10%) после разделения продуктов реакции NER *in vitro*. 20 нМ модельную ДНК (137 п.о.) Fab(5)-dC (дорожка 1), nAnt (дорожка 2), Far-dU (дорожка 3), nFlu (дорожка 4) или Fab(g)-dC/um (дорожка 5) инкубировали с 2.3 мг/мл белками экстракта клеток CHO и 500 нМ специфической матрицей в 1xNER-буфере в течение 45 мин при 30°C. Длина ОДН, использованных в качестве маркеров, указана слева. (Б). Сравнение эффективности эксцизии поврежденных фрагментов ДНК системой NER. Эффективность эксцизии Fab(5)-dC-содержащего фрагмента из ДНК Fab(5)-dC/um принята за единицу.

Количественная оценка уровней формирования продуктов эксцизии системой NER (рис. 24А, Б) позволила расположить модельные ДНК в следующий ряд: ДНК um < Far-dU/um < Fab(g)-dC/um < Fab(5)-dC/um  $\approx$  nFlu/um < nAnt/um. Таким образом, эффективность эксцизии модельного повреждения Fab(5)-dC из ДНК была на 40-60% выше по сравнению с повреждениями Fab(g)-dC и Far-dU; повреждение Fab(5)-dC подвергалось эксцизии с высокой эффективностью, близкой к эффективности эксцизии nAnt и nFlu системой NER.

Сродство фактора XPC-RAD23В к ДНК уменьшалось в ряду: ДНК nFlu/um [292] > ДНК nAnt/um ДНК > Fab(5)-dC/um. Также для ДНК-дуплекса, содержащего Fab(5)-dC, характерен в целом более низкий уровень термостабильности [289], чем для ДНК, содержащих nAnt (раздел 3.2.3, таблица 9) и nFlu [292], и для некоторых типичных субстратов NER [236][236][236][8,236,273]. Мы предположили, что сравнительно высокая эффективность эксцизии Fab(5)-dC может объясняться особенностями его химической структуры, которые обеспечивают более эффективные контакты Fab(5)-dC с сенсорным карманом геликазы XPD и, соответственно, более эффективное прохождение стадии верификации повреждения в процессе NER, и далее проверили эту гипотезу.

### 3.4.2. Определение величины изгиба оси ДНК-дуплекса, индуцированного модельным повреждением Fab(5)-dC.

Для того, чтобы исследовать структурные свойства ДНК-дуплекса, содержащего фотоактивируемое модельное повреждение Fab(5)-dC, мы определили уровень индуцированного им угла изгиба оси ДНК-дуплекса. Проведено сравнение подвижностей 16-звенных Fab(5)-dC-содержащего и немодифицированного ДНК-дуплексов при помощи электрофореза в неденатурирующих условиях (рис. 25).

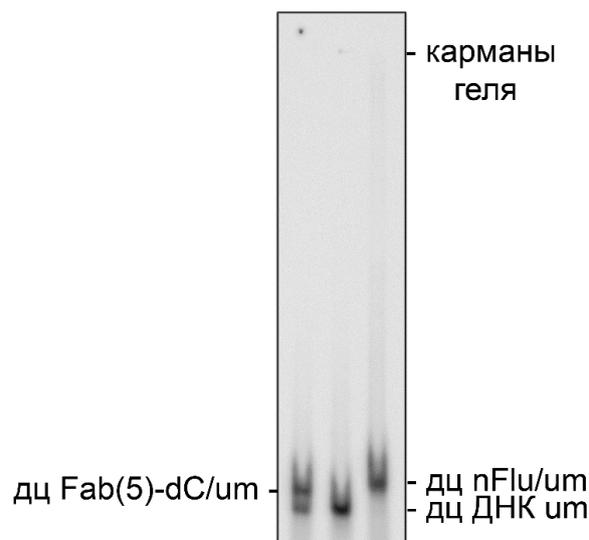


Рис. 25. Радиоавтограф ПААГ (10%) после разделения ДНК-дуплексов Fab(5)-dC/um, nFlu/um и ДНК-дуплекса без модификаций.

Для наглядности мы также использовали ДНК, содержащую нуклеотидную вставку nFlu – модельное повреждение, которое с высокой эффективностью подвергается эксцизии системой NER (раздел 3.4.1, рис. 24) и хорошо охарактеризовано [251,292]. Полученные значения углов изгиба для ДНК Fab(5)-dC/um и nFlu/um составили  $168 \pm 1$  и  $165 \pm 2$  соответственно (таблица 12).

Таблица 12. Углы изгибов ДНК-дуплексов, индуцированные повреждением.

Название ДНК-дуплекса (16 п.о.)	Угол изгиба, °
Fab(5)-dC/um	$168 \pm 1$
nFlu/um	$165 \pm 2$

Согласно литературным данным, для ДНК, содержащих производные В[а]Р, угол изгиба ДНК составляет  $141-167^\circ$  и зависит от окружающей повреждение ДНК нуклеотидной последовательности [227]. Для ДНК, содержащих такие синтетические модельные повреждения как nAnt и Flu-dU угол изгиба оси ДНК составляет  $168$  и  $159^\circ$  [90] соответственно. Таким образом, значения угла изгиба, полученные для ДНК Fab(5)-dC/um, находятся в пределах интервала значений, характерных для субстратов NER [90,186,227]. Следует отметить, что для ДНК Fab(5)-dC/um и nFlu/um оказались очень близкими не только значения углов изгиба осей этих ДНК-дуплексов, но и эффективности эксцизии этих повреждений из ДНК в процессе NER (раздел 3.4.1, рис. 24).

### 3.4.3. Оценка средства геликазы XPD к ДНК, содержащим модифицированные нуклеотиды, несущие объемные группировки, методом торможения в геле.

Следующая после первичного распознавания повреждения ДНК стадия NER – его верификация – осуществляется белковым комплексом ТФПН. Эта стадия обеспечивает проверку наличия химической модификации в ДНК-субстрате [58]. Субъединица XPD фактора ТФПН, ключевой участник этапа верификации повреждения ДНК, взаимодействует с участком поврежденной цепи ДНК-дуплекса, расположенным на расстоянии примерно 22 нуклеотида в 5'-направлении относительно повреждения (рис. 2). Затем геликаза XPD с использованием энергии АТФ расплетает ДНК-дуплекс, продвигаясь по его поврежденной цепи в направлении 3'-конца [98,104]. Специфическое взаимодействие белка XPD с одной из «структурных» субъединиц ТФПН, р44, в несколько раз стимулирует его геликазную активность [97,113,293–295]. Согласно наиболее распространенной модели, дальнейший контакт сенсорного кармана геликазы XPD с объемным повреждением ДНК приводит к его «маркированию», существенному замедлению транслокации белка XPD по одноцепочечной ДНК и инициации сборки «предрасщепляющего» комплекса NER [296].

Для исследования взаимодействия комплекса субъединиц XPD-p44 фактора ТFIИН гриба *Chaetomium thermophilum* с различными модельными повреждениями ДНК были выбраны методы торможения ДНК в геле, флуоресцентного титрования и фотоаффинной модификации. Для того, чтобы подобрать оптимальные условия для экспериментов по фотоаффинной модификации, мы предварительно исследовали связывание белка XPD с модифицированными и немодифицированными оц и дц ДНК методом торможения в геле. Термофильный гриб *Ct* представляет собой перспективный инструмент для проведения биохимических исследований, поскольку является источником термостабильных эукариотических белков. Между генами белка XPD гриба *Ct* и человека имеется высокая степень гомологии, при этом рекомбинантные белки *Ct* могут быть получены в количествах, необходимых для проведения различных биохимических исследований [97,103].

Сродство геликазы XPD к оц ДНК (рис. 26, 27) оказалось значительно выше, чем к дц ДНК, что соответствует литературным данным [97,120,297]: при 200 нМ концентрации белка XPD в реакционной смеси процент оц ДНК, входящей в состав комплексов с белком XPD, составлял около 45%, для дцДНК это значение составляло только 5-10%.

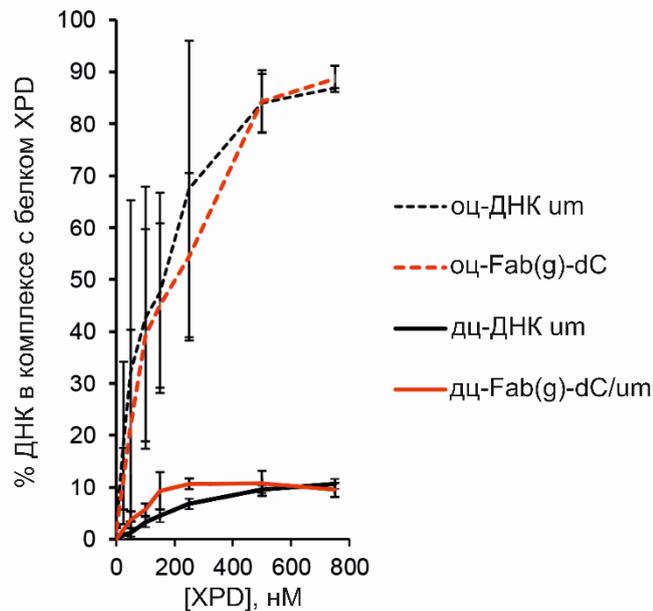


Рис. 26. Количественный анализ соотношения молекул модельных ДНК в комплексах с белком XPD и в несвязанной форме.

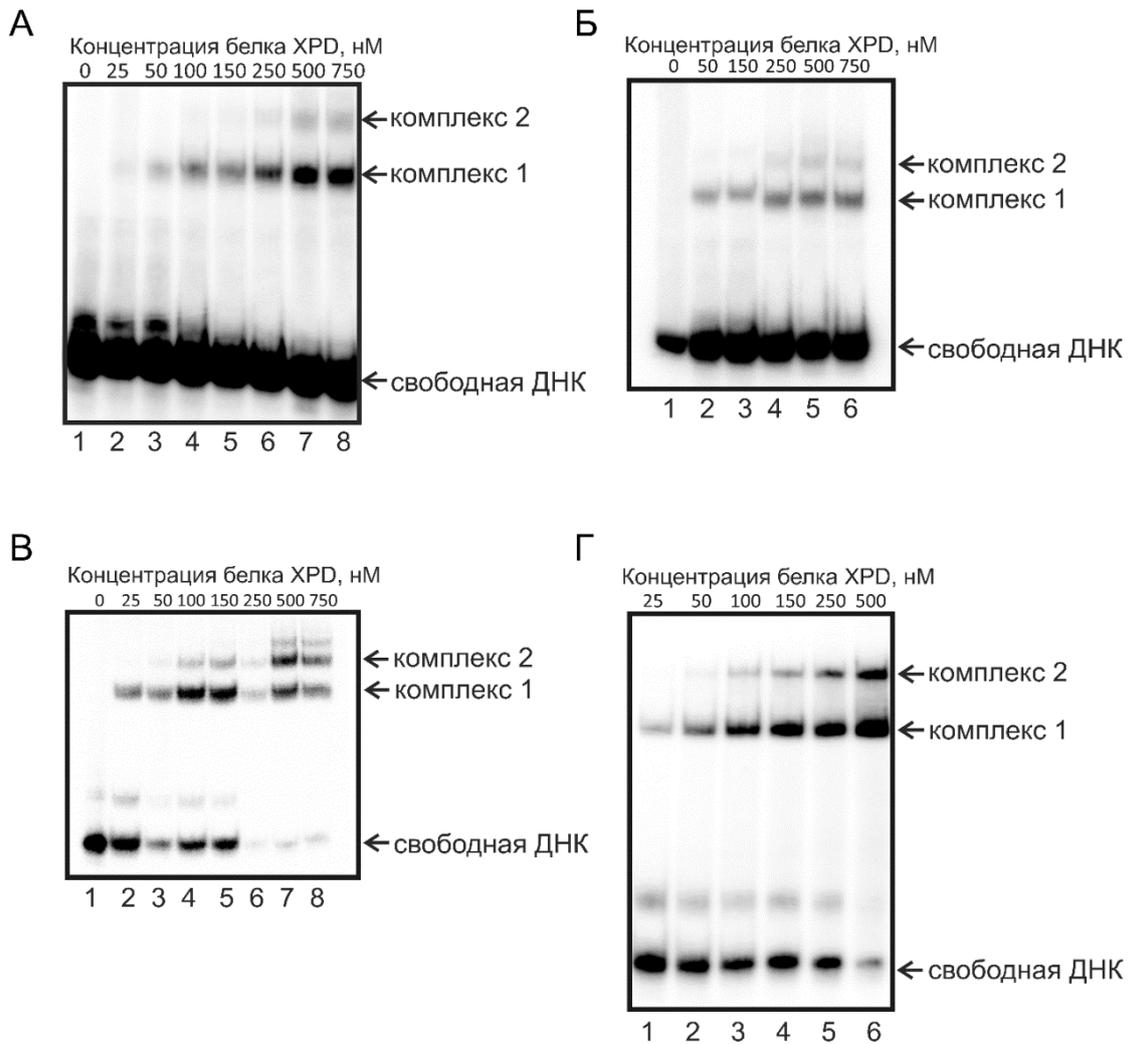


Рис. 27. Радиоавтограф ПААГ (6%) после разделения комплексов, образовавшихся в результате связывания белка 25-750 нМ XPD с 54-звенными ДНК дц Fab(g)-dC/um (А), ДНК um (Б), ДНК оц Fab(g)-dC (В) и оц ДНК um (Г).

Различий в уровнях сродства белка XPD к модифицированной и немодифицированной оц ДНК с применением данного метода выявлено не было (рис. 26, 27). Сродство белка XPD к ДНК дц Fab(g)-dC/um (54 п.о.) было несколько выше (~10 % ДНК в комплексах с белком XPD при его концентрации 200 нМ), чем к немодифицированной дц ДНК той же последовательности (~5% ДНК в комплексах с белком XPD при 200 нМ). В работе [297] методом BLI (англ. “biolayer interferometry”, биослойная интерферометрия) было показано, что белок XPD проявляет значительно более высокое сродство к дц ДНК, содержащим в своей структуре неспаренный участок ДНК длиной 8 нт. Предположительно, различия в сродстве геликазы XPD к модифицированной и немодифицированной ДНК связаны с наличием небольших искажений в структуре ДНК-дуплекса, индуцированных присутствием объемного повреждения.

Повышение концентрации белка XPD в реакционных смесях, содержащих и оц, и дц ДНК (таблица 6) приводило к появлению на радиоавтографах гелей комплексов с низкой электрофоретической подвижностью (рис. 27, комплекс 2). Наиболее вероятной причиной их появления является формирование комплексов со стехиометрией 2:1, в которых с одной молекулой ДНК связаны две молекулы белка XPD. При взаимодействии с одноцепочечной ДНК комплекс 2 детектируется уже при 100 нМ концентрации белка XPD (рис. 27В,Г). Поскольку сродство геликазы XPD к дц ДНК существенно ниже, интенсивная полоса, соответствующая комплексу с низкой электрофоретической подвижностью, появляется только при 500 нМ белка XPD (рис. 27А,Б).

Мы показали, что сродство субъединицы XPD фактора ТФПН с оц ДНК значительно выше, чем с дц ДНК, что соответствует литературным данным. Сродство белка XPD к ДНК дц Fab(g)-dC/um (54 п.о.) несколько выше, чем к немодифицированной дц ДНК той же последовательности, что указывает на специфическое связывание геликазы XPD с поврежденной ДНК. Полученные результаты далее были использованы для проведения экспериментов по фотоаффинной модификации белка XPD.

#### 3.4.4. Исследование эффективности комплексообразования субъединиц XPD-p44 фактора ТФПН с ДНК методом флуоресцентного титрования.

Целью эксперимента было исследование взаимодействия субъединиц XPD и p44 фактора ТФПН с ДНК, содержащими фотоактивируемые модельные повреждения, эффективность эксцизии которых из протяженной дц ДНК системой NER значительно различается. В качестве таких модельных повреждений были выбраны модифицированные азотистые основания – Fab(5)-dC, Fab(g)-dC и Far-dC. Характеристики взаимодействия димера XPD-p44 с модифицированными ДНК были определены посредством измерения анизотропии флуоресценции. Последовательности использованных оц ДНК (49 нт) приведены в таблице 6Б. Сродство комплекса XPD-p44 увеличивалось в ряду: ДНК um < ДНК Far-dC < ДНК Fab(g)-dC << ДНК Fab(5)-dC (рис. 28).

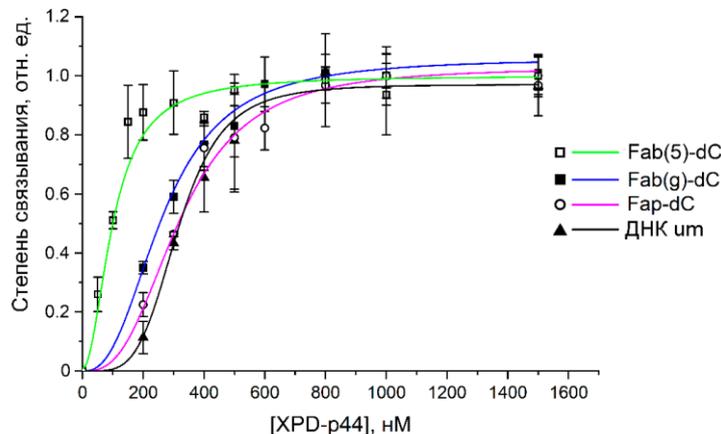


Рис. 28. Кривые титрования связывания димера XPD-p44 с ДНК (10 нМ).

Рассчитанные значения EC50 представлены в таблице 13. Таким образом, мы показали, что средство комплекса субъединиц XPD-p44 фактора TFIIH к ДНК, содержащими фотоактивируемые модельные повреждения, коррелировало с эффективностью эксцизии данных модельных повреждений из линейной протяженной дц ДНК по механизму NER (раздел 3.4.1, рис. 24).

Таблица 13. Характеристики ДНК, содержащих фотоактивируемые модельные повреждения, как субстратов системы NER.

Повреждение ДНК	Fab(5)-dC	Fab(g)-dC	Fap-dC	um
Эффективность эксцизии, отн. ед.	$1.0 \pm 0.1$	$0.6 \pm 0.1$	$\sim 0.1$ [237,238]	$\sim 0$
EC50 (XPD-p44 с оц ДНК), нМ	$109 \pm 15$	$265 \pm 34$	$316 \pm 38$	$321 \pm 46$
Эффективность аффинной модификации белка XPD фс ДНК-зондом при отсутствии АТФ и белка p44, отн. ед.	$0.4 \pm 0.0$	$1.0 \pm 0.1$	$0.7 \pm 0.1$	–
Увеличение уровня фотоаффинной модификации белка XPD фс ДНК-зондом при добавлении АТФ (при отсутствии белка p44)	в $3.2 \pm 1.8$ раз	в $2.2 \pm 0.4$ раз	в $1.1 \pm 0.4$ раз	–

### 3.4.5. Исследование взаимодействия субъединиц XPD и p44 фактора TFIIH с ДНК, несущими фотоактивируемые модельные повреждения, методом фотоаффинной модификации.

С применением метода фотоаффинной модификации проведено сравнение взаимодействия субъединиц XPD и p44 фактора TFIIH с ДНК-зондами, содержащими фотоактивируемые модельные повреждения Fab(5)-dC, Fab(g)-dC и Fap-dC. Характеристики фотоактивируемых модельных повреждений ДНК, использованных в эксперименте, приведены в таблице 13, последовательности использованных ДНК-зондов (54/38 нт) – в таблице 6В. Ковалентные аддукты белка XPD с 54-звенными оц ДНК образовывались в три раза более эффективно, чем с дц ДНК (рис. 29А). Этот результат был достаточно ожидаемым, поскольку более высокий уровень средства, проявляемый геликазой XPD к одноцепочечной ДНК (раздел 3.4.3, рис. 26, 27), сопровождается более длительным временем пребывания на ней белка, то есть большей стабильностью образуемых комплексов.

При фотоаффинной модификации белкового комплекса XPD-p44 фс ДНК-зондами, содержащими фотоактивируемое повреждение Fab(5)-dC, Fab(g)-dC или Fap-dC, были выявлены различия в его взаимодействии с модифицированными ДНК. фс ДНК содержали одноцепочечный фрагмент (5'-оц выступающий конец, 16 нт) и двухцепочечный фрагмент (38 п.о.), несущий фотоактивируемое повреждение; [<sup>32</sup>P]-метка была введена по 5'-концу содержащей повреждение цепи ДНК.

В выбранных условиях белок XPD формировал мажорный аддукт с одинаковой электрофоретической подвижностью со всеми фс зондами как при отсутствии, так и в присутствии АТР

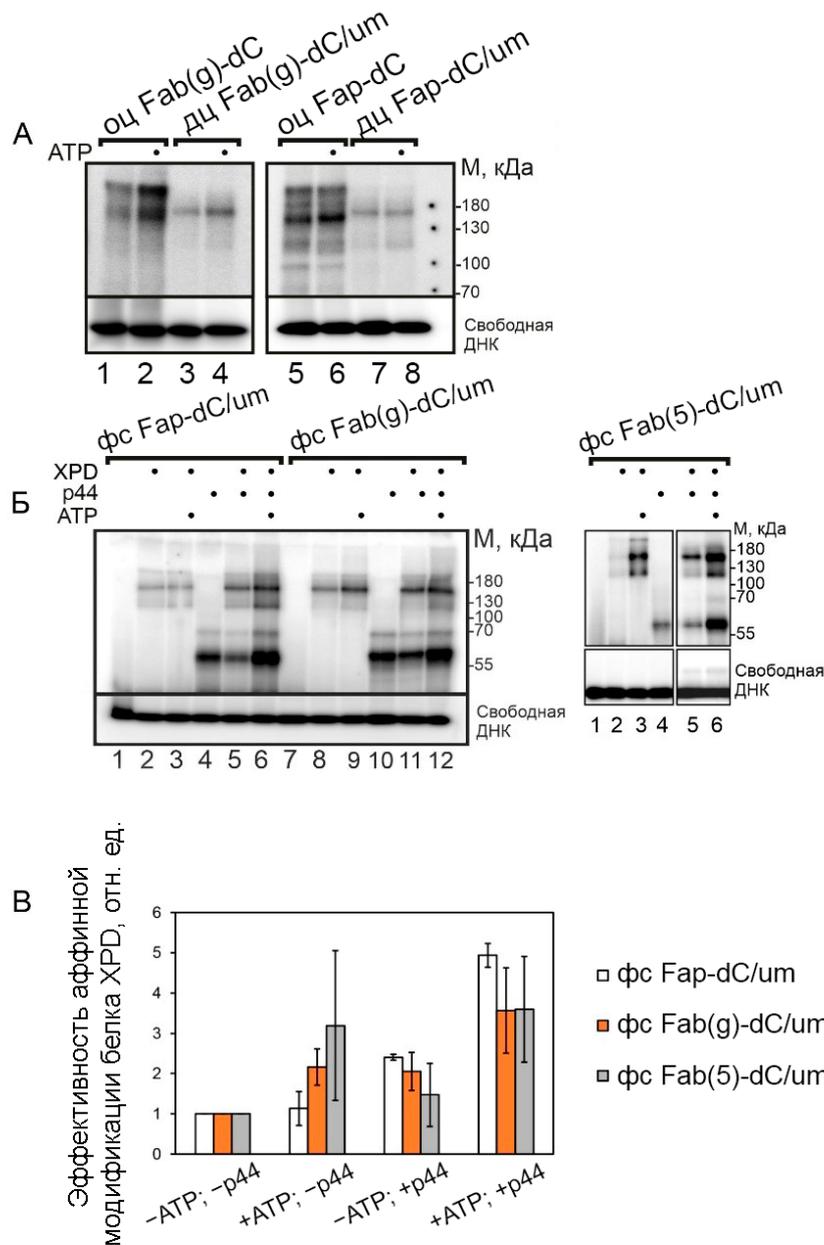


Рис. 29. (А), (Б). Радиоавтографы ПААГ после разделения продуктов фотоаффинной модификации белков XPD и p44 ДНК-зондами. Реакционные смеси содержали 200 нМ белки XPD и p44, 100 нМ оц, дц или фс ДНК-зонды и 2.5 мМ АТР в буфере (20 мМ HEPES pH 7.5, 50 мМ KCl, 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 1 мМ ТСЕР). Реакционные смеси инкубировали при температуре 30°C в течение 15 мин и затем облучали УФ-светом с длиной волны 312 нм (прибор BioLink BLX Vilber Lourmat, Франция) в течение 10 мин при интенсивности 1.5 Дж/(см<sup>2</sup>\*мин). (В). Зависимость эффективности аффинной модификации белка XPD от типа ДНК-зонда и наличия / отсутствия АТР и белка p44 в реакционной смеси. Уровни мечения белка XPD при отсутствии АТР и белка p44 были приняты за единицу.

и белка р44 (рис. 29Б). При отсутствии белка р44 добавление АТФ повышало уровень образования аддуктов геликазы XPD с ДНК: с фс Fab(5)-dC/um – приблизительно в 3.5 раза, фс Fab(g)-dC/um в 2.1 раз, в случае ДНК фс Far-dC/um уровень модификации этого белка не повышался (рис. 29Б – левая панель: дорожки 2,3,8,9; правая панель – дорожки 2,3; В). Добавление АТФ в реакционную смесь, содержащую комплекс XPD-р44, существенно стимулировало фотоаффинную модификацию геликазы XPD с использованием ДНК фс Far-dC/um (в 2.6 раза) и в меньшей степени – с использованием ДНК фс Fab(5)-dC/um и фс Fab(g)-dC/um – примерно в 2 раза (рис. 29Б – левая панель: дорожки 5,6,11,12; правая панель – дорожки 5,6; В).

В отличие от нерепарируемого Far-dC [258], повреждение Fab(5)-dC подвергается эксцизии комплексом белков NER со сравнительно высокой эффективностью, а Fab(g)-dC – с умеренно эффективно (раздел 3.4.1, рис. 24). Таким образом, уровень формирования аддуктов белка XPD с ДНК коррелировал с эффективностью эксцизии повреждения ДНК в процессе NER и зависел от присутствия АТФ и белка-партнера – р44. Однако добавление в реакционную смесь белка р44, который примерно на порядок повышает геликазную активность белка XPD [97], делало разницу в уровнях мечения XPD Fab(5)-dC-, Fab(g)-dC- и Far-dC-содержащими ДНК-зондами менее существенной (рис. 29Б,В).

Можно предположить, что значительное увеличение интенсивности модификации белка XPD с использованием фс Fab(5)-dC-содержащего ДНК-дуплекса, которое наблюдалось при добавлении в реакционную смесь АТФ (таблица 13, рис. 29Б,В), а также повышенное сродство, которое проявлял белковый комплекс XPD-р44 к оц ДНК, содержащей Fab(5)-dC (таблица 13), связаны с более длительным контактом геликазы с этим фотоактивируемым повреждением ДНК, для которого характерна сравнительно высокая эффективность эксцизии в процессе NER. Линкерный фрагмент повреждения Fab(5)-dC, связывающий С5 азотистого основания с плоским фторазидобензоильным кольцом, содержит жесткий элемент – тройную связь (рис. 10). Возможно, такая химическая структура Fab(5)-dC обеспечивает его более эффективные контакты с сенсорным карманом геликазы XPD по сравнению с повреждением Fab(g)-dC, обуславливая различия в эффективности их эксцизии системой NER.

Белок р44 с высокой эффективностью формировал аддукты со всеми фотоактивируемыми фс ДНК. Стоит отметить, что в присутствии геликазы XPD и при отсутствии АТФ белок р44 начал метиться немного менее эффективно (на 18-26%), что может быть результатом конкуренции с белком XPD за связывание с ДНК, но при одновременном добавлении АТФ и белка XPD уровень его модификации повышался примерно в 2 раза, что было показано на разных фс ДНК-зондах (рис. 29Б, левая панель: дорожки 4-6, 10-12, правая панель: – дорожки 4-6).

Ранее считалось, что субъединица р44 фактора ТFIИН выполняет лишь «структурную» функцию в распознавании повреждения ДНК, в то время как ключевую роль в процессе верификации повреждения играет геликаза XPD. Полученные нами данные указывают на возможность контакта субъединицы р44 с повреждением ДНК в процессе его верификации. Это предположение частично подтверждается недавно опубликованными данными [294] о специфичности взаимодействия гетеродимера р44-р62 с поврежденной ДНК, и будет предметом дальнейших исследований.

Полученные данные указывают на то, что комплекс рекомбинантных белков гриба *Sr* – субъединиц XPD и р44 фактора ТFIИН, участвующего в процессе NER на стадии верификации повреждения, селективно взаимодействует с объемными повреждениями ДНК. Эффективность взаимодействия комплекса XPD-р44 с ДНК, содержащими модельные объемные повреждения – звенья цитидина с фторазидобензоильной или фторхлоразидопиридинильной группировками, коррелирует с эффективностью их эксцизии системой NER.

### **Заключение**

Данная работа представляет собой систематическое экспериментальное исследование свойств ДНК, содержащих объемные повреждения в составе кластеров, как субстратов системы NER. Показано, что эффективность эксцизии объемного повреждения ДНК системой NER снижается в присутствии в комплементарной цепи второго объемного повреждения либо аналога AP-сайта. Выявлены характерные для разных типов повреждений интервалы позиций противоположной цепи ДНК, при расположении в пределах которых дополнительного повреждения наблюдается подавление эксцизии, катализируемой системой NER. Установлено, что белковый фактор XPC-RAD23B, который осуществляет первичное распознавание повреждения в процессе общегеномной NER, напротив, обладает повышенным сродством к ДНК, содержащим кластерные повреждения, по сравнению с ДНК, содержащей одиночное объемное повреждение. Оценены изменения геометрии и термостабильности дц ДНК, вызванные присутствием в ДНК-дуплексе кластерных повреждений.

На основании экспериментальной оценки свойств ДНК, содержащих кластерные повреждения, как субстратов системы NER, а также исследования их структур с применением компьютерного моделирования предложена модель, согласно которой устойчивость к репарации объемного повреждения (nFlu), расположенного в кластере с аналогом AP-сайта, возникает из-за «схлопнутого» состояния двойной спирали в месте введения объемного повреждения ДНК, а также возможности прямого взаимодействия между повреждениями, образующими кластер. Эта специфическая топология поврежденного участка ДНК в сочетании с возможностью образования непродуктивных комплексов XPC-ДНК с участками молекулы, удаленными от места введения

nFlu, препятствует ее продуктивному распознаванию фактором XPC-RAD23B и дальнейшему протеканию процесса эксцизии.

Также в данной работе проанализировано взаимодействие рекомбинантных белков термофильного гриба *Ct*, субъединиц XPD и p44 фактора TFIIH, осуществляющего верификацию повреждений, с ДНК, содержащими репарируемые и нерепарируемые в процессе NER модельные повреждения – звенья цитидина с фторазидобензоильной или фторхлоразидопиридилльной группировками. Показано, что эффективность эксцизии модифицированных звеньев цитидина системой NER из дц ДНК коррелирует с эффективностью взаимодействия белкового комплекса XPD-p44 с ДНК, содержащими модельные повреждения. Полученные результаты подтверждают способность комплекса субъединиц XPD-p44 фактора TFIIH гриба *Ct* различать объемные повреждения ДНК и указывают на то, что эффективность эксцизии данных модельных повреждений зависит от эффективности прохождения стадии верификации в процессе NER.

## Выводы

---

1. Эффективность эксцизии объемных повреждений ДНК системой эксцизионной репарации нуклеотидов (NER) в случае их расположения в составе группы повреждений, находящихся на противоположных цепях ДНК в пределах одного-двух витков спирали (двухцепочечного кластера), существенно снижена. Степень снижения эксцизии зависит от химической структуры повреждений, образующих двухцепочечный кластер, и расстояния между ними в молекуле ДНК.
2. Повышенное сродство фактора XPC-RAD23B, инициирующего процесс общегеномной NER, к ДНК, содержащим объемные повреждения в составе двухцепочечного кластера, коррелирует со снижением эффективности их эксцизии системой NER. Устойчивость объемного ненуклеотидного повреждения с флуоресцибельным остатком (nFlu), расположенного в составе кластера со вставкой на основе фосфодиэфира диэтиленгликоля (аналогом апуринового/апиримидинового сайта), к эксцизии по механизму NER обусловлена специфической топологией поврежденного участка ДНК, которая препятствует его продуктивному распознаванию фактором XPC-RAD23B.
3. Комплекс субъединиц XPD-p44 фактора TFIIH, участвующего в процессе NER на стадии верификации повреждения, термофильного гриба *Chaetomium thermophilum* селективно взаимодействует с объемными повреждениями в ДНК. Эффективность взаимодействия комплекса XPD-p44 с ДНК, содержащими модельные объемные повреждения – звенья цитидина с фторазидобензоильными или фторхлоразидопиридильными группировками, коррелирует с эффективностью их эксцизии системой NER.

### Список сокращений и условных обозначений

(d)ATP	(дезокси)аденозинтрифосфат;
(d)CTP	(дезокси)цитидинтрифосфат;
6-4PP	пиримидин-(6,4)-пиримидиновый димер;
AAF-dG	аддукт N-ацетил-2-аминофлуорена с ДНК с гуанозином;
ADP	аденозин-5'-пирофосфат;
AFB(1)	афлатоксин В(1);
B[a]P-dG	аддукт производного бенз[а]пирена с основанием гуанина;
BER	эксцизионная репарация оснований;
BHD	$\beta$ -шпилечный домен (англ. “ $\beta$ -hairpin domain”);
CHO	линия клеток яичника китайского хомячка (англ. “Chinese hamster ovary”);
CPD	циклобутан-пиримидиновый димер;
<i>Ct</i>	<i>Chaetomium thermophilum</i> ;
dC	дезоксицитидин;
DEG	вставка на основе фосфодиэфира диэтиленгликоля;
dG	дезоксигуанозин;
dNTP	дезоксирибонуклеозидтрифосфат (dATP, dTTP, dGTP, dCTP или dUTP);
DTT	дителиотреитол;
EC50	полумаксимальная эффективная концентрация;
FAAF-dG	флюориновое производное N-(2'-дезоксигуанозин-8-ила)-2-ацетаминофлуорена;
Fab(5)-dCMP	5-[3-(4-азидо-2,3,5,6-тетрафторбензамидо)пропоксипроп-1-инил]-2'-дезоксицитидин 3' фосфат;
Fab(g)-dCMP	экзо-N-[(4-азидотетрафторбензилиденгидразинокарбонил)-бутилкарбамоил]-2'-дезоксицитидин 3' фосфат;
FAM	флуоресцеин;
Fap-dCMP	экзо-N-[2-[N-(4-азидо-2,5-дифторо-3-хлорпиримидин-6-ил)-3-амино-пропионил]аминоэтил]-2'-дезоксицитидин 3' фосфат;
Fap-dUMP	5-{N-[N-(4-азидо-2,5-дифторо-3-хлорпиримидин-6-ил)-3-аминопропионил]-транс-аминопропенил-1}-2'-дезоксиуридин 3' фосфат;
GG-NER	система общегеномной NER (англ. “global genome NER”);
HEPES	4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота;

MAT1	субъединица комплекса САК;
nAnt	ненуклеотидный фрагмент модифицированной цепи ДНК, содержащий N-[6-(9-антраценкарбамоил)гексаноил]-3-амино-1,2-пропандиол;
NER	эксцизионная репарация нуклеотидов;
nFlu	ненуклеотидный фрагмент модифицированной цепи ДНК, содержащий (N-[6-(дипивалоил-5(6)-флуоресцеинилкарбамоил)гексаноил]-O1-(4,4'-диметокситритил)-O2-[(ди-изопропиламино)(2-цианоэтокси)фосфино]-3-амино-1,2-пропандиол);
PBS	натрий-фосфатный буфер;
PCNA	ядерный антиген пролиферирующих клеток;
RFC	репликативный фактор C;
RPA	репликативный белок A;
SDS	додецилсульфат натрия;
TCEP	трис(2-карбокситетил)фосфин;
TC-NER	NER, сопряженная с транскрипцией (англ. “transcription-coupled NER”);
T <sub>m</sub>	температура плавления;
UDG	урацил-ДНК-гликозилаза;
XPA, XPB, XPC,	белки, участвующие в NER
XPG, XPF	(англ. “xeroderma pigmentosum type A, B, C, G, F complementing proteins”);
XRCC1, ERCC1	белки-участники процесса репарации ДНК (англ. “X-ray repair cross-complementing protein 1” и “excision repair cross complementing-group 1”);
APE1	апуриновая/апиридиновая эндонуклеаза 1;
AP-сайт	апуриновый/апиридиновый сайт;
АФК	активные формы кислорода;
БСА	бычий сывороточный альбумин;
ДНК	дезоксирибонуклеиновая кислота;
ДНК um	немодифицированная ДНК;
дц ДНК	двухцепочечная ДНК;
ДЦР	двухцепочечный разрыв ДНК;
ИИ	ионизирующее излучение;
МД траектория	молекулярно-динамическая траектория;
нм	нанометр;
нт	нуклеотид;
ОДН	олигодезоксирибонуклеотид;
оц ДНК	одноцепочечная ДНК;
ОЦР	одноцепочечный разрыв ДНК;

п.о.	пара оснований;
ПААГ	полиакриламидный гель;
ПАУ	полициклические ароматические углеводороды;
ПСА	персульфат аммония;
САК	комплекс CDK-активирующей киназы;
ТЕМЕД	тетраметилэтилендиамин;
Трис	трис(гидроксиметил)аминометан;
УФ	ультрафиолет;
фс ДНК	ДНК-субстрат с удлиненным одноцепочечным 5'-концом одной из цепей (англ. "fs – fork substrate");
ЭДТА	этилендиаминтетрауксусная кислота.

## Благодарности

---

Автор выражает искреннюю благодарность коллективу лаборатории биоорганической химии ферментов ИХБФМ СО РАН за ценные советы и поддержку во время выполнения данной работы. Автор выражает признательность к.х.н. Ирине Олеговне Петрусевой и д.б.н. Светлане Николаевне Ходыревой за предоставление препаратов белков, использованных в работе. Автор отдельно благодарит к.х.н. Анарбаева Рашида Октамовича за помощь в освоении метода исследования ДНК-белковых взаимодействий посредством измерения анизотропии флуоресценции. Автор выражает благодарность к.ф.-м.н. Александру Анатольевичу Ломзову за проведение экспериментов по дифференциальному плавлению и моделирование молекулярной динамики ДНК, содержащих кластерные повреждения, – полученные им данные помогли значительно продвинуться в интерпретации экспериментальных результатов. Автор благодарит д.х.н. Владимира Николаевича Сильникова за дизайн фотоактивируемого аналога объемных повреждений, Fab(5)-dC.

Автор выражает признательность к.х.н. Ирине Олеговне Петрусевой, одной из двух своих научных руководителей, за обучение методикам экспериментальной работы, помощь в планировании работы, анализе результатов исследований и при подготовке публикаций. Автор благодарит зав. лаборатории биоорганической химии ферментов и своего второго научного руководителя, д.х.н., акад. РАН Лаврик Ольгу Ивановну за ее помощь в организации работы, поддержку и активное участие в развитии работы.

**Список литературы**

1. Edifizi D., Schumacher B. Genome instability in development and aging: Insights from nucleotide excision repair in humans, mice, and worms // *Biomolecules*.– 2015.– V. 5, (3).– P. 1855–1869.
2. Marteijn J.A., Lans H., Vermeulen W., Hoeijmakers J.H. Understanding nucleotide excision repair and its roles in cancer and ageing // *Nat Rev Mol Cell Biol*.– 2014.– V. 15, (7).– P. 465–481.
3. Bergoglio V., Magnaldo T. Nucleotide excision repair and related human diseases. // *Genome dynamics*.– 2006.– V. 1.– P. 35–52.
4. Duan M., Ulibarri J., Liu K.J., Mao P. Role of nucleotide excision repair in cisplatin resistance // *International Journal of Molecular Sciences*.– 2020.– V. 21, (23).– P. 1–13.
5. Torgovnick A., Schumacher B. DNA repair mechanisms in cancer development and therapy // *Front. Genet*.– 2015.– V. 6.– P. 1–15.
6. Hess M.T., Gunz D., Luneva N., Geacintov N.E., Naegeli H. Base pair conformation-dependent excision of benzo[a]pyrene diol epoxide-guanine adducts by human nucleotide excision repair enzymes // *Mol Cell Biol*.– 1997.– V. 17, (12).– P. 7069–7076.
7. Liu Z., Ding S., Kropachev K., Lei J., Amin S., Broyde S. Resistance to Nucleotide Excision Repair of Bulky Guanine Adducts Opposite Abasic Sites in DNA Duplexes and Relationships between Structure and Function // *PLoS One*.– 2015.– V. 10, (9).– e0137124.
8. Hilton B., Gopal S., Xu L., Mazumder S., Musich P.R., Cho B.P., Zou Y.Z. Dissociation dynamics of XPC-RAD23B from damaged DNA Is a determining factor of NER efficiency // *PLoS One*.– 2016.– V. 11, (6).– P. 1–21.
9. Watanabe R., Rahmanian S., Nikjoo H. Spectrum of Radiation-Induced Clustered Non-DSB Damage – A Monte Carlo Track Structure Modeling and Calculations // *Radiat. Res*.– 2015.– V. 183, (5).– P. 525–540.
10. Greinert R., Volkmer B., Henning S., Breitbart E.W., Greulich K.O., Cardoso M.C., Rapp A. UVA-induced DNA double-strand breaks result from the repair of clustered oxidative DNA damages // *Nucleic Acids Res*.– 2012.– V. 40, (20).– P. 10263–10273.
11. Kouass Sahbani S., Rezaee M., Cloutier P., Sanche L., Hunting D.J. Non-DSB clustered DNA lesions induced by ionizing radiation are largely responsible for the loss of plasmid DNA functionality in the presence of cisplatin // *Chem. Biol. Interact*.– 2014.– V. 217.– P. 9–18.
12. Dong Y., Chen Y., Zhou L., Shao Y., Fu X., Zheng Y. Molecular efficacy of radio- and chemotherapy sequences from direct DNA damage measurements // *Int. J. Radiat. Biol*.– 2017.– V. 93, (11).– P. 1274–1282.
13. Zheng Y., Sanche L. Clustered DNA Damages induced by 0.5 to 30 eV Electrons // *Int. J. Mol. Sci*.– 2019.– V. 20, (15).– 3749.

14. Kidane D., Murphy D.L., Sweasy J.B. Accumulation of abasic sites induces genomic instability in normal human gastric epithelial cells during *Helicobacter pylori* infection // *Oncogenesis*.– 2014.– V. 3, (11).– e128.
15. Goodman M., Bostick R.M., Dash C., Terry P., Flanders W.D., Mandel J. A summary measure of pro- and anti-oxidant exposures and risk of incident, sporadic, colorectal adenomas // *Cancer Causes Control*.– 2008.– V. 19, (10).– P. 1051–1064.
16. Sage E., Harrison L. Clustered DNA lesion repair in eukaryotes: Relevance to mutagenesis and cell survival // *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen*.– 2011.– V. 711, (1–2).– P. 123–133.
17. Georgakilas A.G., O'Neill P., Stewart R.D. Induction and Repair of Clustered DNA Lesions: What Do We Know So Far? // *Radiat. Res*.– 2013.– V. 180, (1).– P. 100–109.
18. David-Cordonnier M.H., Laval J., O'Neill P. Recognition and kinetics for excision of a base lesion within clustered dna damage by the *escherichia coli* proteins fpg and nth // *Biochemistry*.– 2001.– V. 40, (19).– P. 5738–5746.
19. O'Neill J.P. DNA damage, DNA repair, cell proliferation, and DNA replication: How do gene mutations result? // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*.– 2000.– V. 97, (21).– P. 11137–11139.
20. Zeman M.K., Cimprich K.A. Causes and consequences of replication stress // *Nature Cell Biology*.– 2014.– V. 16, (1).– P. 2–9.
21. Starostenko L. V., Rechkunova N.I., Lebedeva N.A., Lomzov A.A., Koval V. V., Lavrik O.I. Processing of the abasic sites clustered with the benzo[a]pyrene adducts by the base excision repair enzymes // *DNA Repair (Amst)*.– 2017.– V. 50.– P. 43–53.
22. Gillet L.C., Scharer O.D. Molecular mechanism of mammalian global genome nucleotide excision repair // *Chem Rev*.– 2006.– V. 106, (2).– P. 253–276.
23. Vijg J., Suh Y. Genome Instability and Aging // *Annu. Rev. Physiol*.– 2013.– V. 75, (1).– P. 645–668.
24. Friedberg E.C. How nucleotide excision repair protects against cancer // *Nat. Rev. Cancer*.– 2001.– V. 1, (1).– P. 22–33.
25. Friedberg E.C. A history of the DNA repair and mutagenesis field. The discovery of base excision repair. // *DNA Repair (Amst)*.– 2016.– V. 37.– P. A35–A39.
26. Schärer O.D. Nucleotide excision repair in Eukaryotes // *Cold Spring Harb. Perspectives Biol*.– 2013.– V. 5, (10).– P. 1–19.
27. Chen Z. Defining the function of XPC protein in psoralen and cisplatin-mediated DNA repair and mutagenesis // *Carcinogenesis*.– 2003.– V. 24, (6).– P. 1111–1121.
28. Kelley M., Logsdon D., Fishel M. Targeting DNA repair pathways for cancer therapy // *Futur. Oncol*.– 2014.– V. 10, (7).– P. 1215–1237.

29. Benhamou S., Sarasin A. Variability in nucleotide excision repair and cancer risk: a review // *Mutat. Res. - Rev. Mutat. Res.*– 2000.– V. 462, (2–3).– P. 149–158.
30. Leung E.M.K., Chan W. Noninvasive measurement of aristolochic acid-DNA adducts in urine samples from aristolochic acid-treated rats by liquid chromatography coupled tandem mass spectrometry: Evidence for DNA repair by nucleotide-excision repair mechanisms // *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.*– 2014.– V. 766–767.– P. 1–6.
31. Hoeijmakers J.H.J. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer // *Nature.*– 2001.– V. 411, (6835).– P. 366–374.
32. Gunz D., Hess M.T., Naegeli H., For E., Probing A.T. Recognition of DNA Adducts by Human Nucleotide Excision Repair // *J. Biol. Chem.*– 1996.– V. 271, (41).– P. 25089–25098.
33. Melis J.P.M., van Steeg H., Luijten M., Steeg H. Van. Oxidative DNA Damage and Nucleotide Excision Repair // *Antioxid. Redox Signal.*– 2013.– V. 18, (18).– P. 2409–2419.
34. Dianov G., Bischoff C., Piotrowski J., Vilhelm A., Bohr. Repair pathways for processing of 8-oxoguanine in DNA by mammalian cell extracts // *J. Biol. Chem.*– 1998.– V. 273, (50).– P. 33811–33816.
35. Wood R. Mammalian Nucleotide Excision Repair Proteins and Interstrand Crosslink Repair // *Cuad. Psicol. del Deport.*– 2016.– V. 16, (3).– P. 89–100.
36. Wang J., Cao H., You C., Yuan B., Bahde R., Gupta S., Nishigori C., Niedernhofer L.J., Brooks P.J., Wang Y. Endogenous Formation and Repair of Oxidatively Induced G[8-5 m]T Intrastrand Cross-Link Lesion // *Nucleic Acids Research.*– 2012.– P. 7368–7374.
37. Baker D.J., Wuenschell G., Xia L., Termini J., Bates S.E., Riggs A.D., O'Connor T.R. Nucleotide excision repair eliminates unique DNA-protein cross-links from mammalian cells // *J. Biol. Chem.*– 2007.– V. 282, (31).– P. 22592–22604.
38. Kitsera N., Rodriguez-Alvarez M., Emmert S., Carell T., Khobta A. Nucleotide excision repair of abasic DNA lesions // *Nucleic Acids Res.*– 2019.– V. 47, (16).– P. 8537–8547.
39. Rastogi R.P., Richa, Kumar A., Tyagi M.B., Sinha R.P. Molecular mechanisms of ultraviolet radiation-induced DNA damage and repair // *J. Nucleic Acids.*– 2010.– 592980.
40. Paul D., Mu H., Zhao H., Ouerfelli O., Jeffrey P.D., Broyde S., Min J.H. Structure and mechanism of pyrimidine-pyrimidone (6-4) photoproduct recognition by the Rad4/XPC nucleotide excision repair complex // *Nucleic Acids Res.*– 2019.– V. 47, (12).– P. 6015–6028.
41. Sarasin A. An overview of the mechanisms of mutagenesis and carcinogenesis // *Mutation Research - Reviews in Mutation Research.*– 2003.– V. 544, (2–3).– P. 99–106.
42. Vermeulen W., Foustieri M. Mammalian transcription-coupled excision repair // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*– 2013.– V. 5, (8).– P. 1–16.

43. Mazouzi A., Battistini F., Moser S.C., Ferreira da Silva J., Wiedner M., Owusu M., Lardeau C.H., Ringler A., Weil B., Neesen J., Orozco M., Kubicek S., Loizou J.I. Repair of UV-Induced DNA Damage Independent of Nucleotide Excision Repair Is Masked by MUTYH // *Mol. Cell.*– 2017.– V. 68, (4).– P. 797–807.
44. Karran P., Brem R. Protein oxidation, UVA and human DNA repair // *DNA Repair.*– 2016.– V. 44.– P. 178–185.
45. Turesky R., Marchand L. Metabolism and Biomarkers of Heterocyclic Aromatic Amines in Molecular Epidemiology Studies: Lessons Learned from Aromatic Amines // *Chem Res Toxicol.*– 2011.– V. 31, (11).– P. 1886–1893.
46. Baird W.M., Hooven L.A., Mahadevan B. Carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts and mechanism of action // *Environ. Mol. Mutagen.*– 2005.– V. 45, (2–3).– P. 106–114.
47. Bulbulyan M.A., Figgs L.W., Zahm S.H., Savitskaya T., Goldfarb A., Astashevsky S., Zaridze D. Cancer incidence and mortality among Beta-naphthylamine and benzidine dye workers in Moscow // *Int. J. Epidemiol.*– 1995.– V. 24, (2).– P. 266–275.
48. Mu H., Kropachev K., Wang L., Zhang L., Kolbanovskiy A., Kolbanovskiy M., Geacintov N.E., Broyde S. Nucleotide excision repair of 2-acetylaminofluorene-and 2-aminofluorene-(C8)-guanine adducts: Molecular dynamics simulations elucidate how lesion structure and base sequence context impact repair efficiencies // *Nucleic Acids Res.*– 2012.– V. 40, (19).– P. 9675–9690.
49. Bedard L.L., Massey T.E. Aflatoxin B1-induced DNA damage and its repair // *Cancer Lett.*– 2006.– V. 241, (2).– P. 174–183.
50. Williams J.H., Phillips T.D., Jolly P.E., Stiles J.K., Jolly C.M., Aggarwal D. Human aflatoxicosis in developing countries: a review of toxicology, exposure, potential health consequences, and interventions // *Am J Clin Nutr.*– 2018.– P. 1106–1122.
51. Georgianna D.R., Fedorova N.D., Burroughs J.L., Dolezal A.L., Woloshuk C.P., Yu J., Keller N.P. Beyond aflatoxin: four distinct expression patterns and functional roles associated with *Aspergillus flavus* secondary metabolism gene clusters // *Mol Plant Pathol.*– 2014.– V. 11, (2).– P. 213–226.
52. Baik M.H., Friesner R.A., Lippard S.J. Theoretical Study of Cisplatin Binding to Purine Bases: Why Does Cisplatin Prefer Guanine over Adenine? // *J. Am. Chem. Soc.*– 2003.– V. 125, (46).– P. 14082–14092.
53. Wang D., Lippard S.J. Cellular processing of platinum anticancer drugs // *Nat. Rev. Drug Discov.*– 2005.– V. 4, (4).– P. 307–320.
54. Reardon J.T., Vaisman A., Chaney S.G., Sancar A. Efficient Nucleotide Excision Repair of Cisplatin, Oxaliplatin, and Bis-aceto-amine-dichloro-cyclohexylamine-platinum (IV) ( JM216 ) Platinum Intrastrand DNA Diadducts // *CANCER Res.*– 1999.– V. 59.– P. 3968–3971.

55. Петрусева И.О., Лаврик О.И., Евдокимов А.Н. Молекулярные механизмы действия системы общегеномной эксцизионной репарации нуклеотидов // *Acta Naturae*.– 2014.– Т. 6, (1).– С. 23–34.
56. Fousteri M., Mullenders L.H.F. Transcription-coupled nucleotide excision repair in mammalian cells: Molecular mechanisms and biological effects // *Cell Res*.– 2008.– V. 18, (1).– P. 73–84.
57. Min J., Pavletich N.P. Recognition of DNA damage by the Rad4 nucleotide excision repair protein // *Nature*.– 2007.– V. 449.– P. 570–575.
58. Sugawara K., Okamoto T., Shimizu Y., Masutani C., Iwai S., Hanaoka F. A multistep damage recognition mechanism for global genomic nucleotide excision repair // *Genes Dev*.– 2001.– V. 15, (5).– P. 507–521.
59. Sugawara K., Shimizu Y., Iwai S., Hanaoka F. A molecular mechanism for DNA damage recognition by the xeroderma pigmentosum group C protein complex // *DNA Repair (Amst)*.– 2002.– V. 1, (1).– P. 95–107.
60. Sugawara K., Ng J.M.Y., Masutani C., Iwai S., Van Der Spek P.J., Eker A.P.M., Hanaoka F., Bootsma D., Hoeijmakers J.H.J. Xeroderma pigmentosum group C protein complex is the initiator of global genome nucleotide excision repair // *Mol. Cell*.– 1998.– V. 2, (2).– P. 223–232.
61. Nishi R., Okuda Y., Watanabe E., Mori T., Iwai S., Masutani C., Sugawara K., Hanaoka F. Centrin 2 Stimulates Nucleotide Excision Repair by Interacting with Xeroderma Pigmentosum Group C Protein // *Mol. Cell. Biol*.– 2005.– V. 25, (13).– P. 5664–5674.
62. Bergink S., Toussaint W., Luijsterburg M.S., Dinant C., Alekseev S., Hoeijmakers J.H.J., Dantuma N.P., Houtsmuller A.B., Vermeulen W. Recognition of DNA damage by XPC coincides with disruption of the XPC-RAD23 complex // *J. Cell Biol*.– 2012.– V. 196, (6).– P. 681–688.
63. Lommel L., Ortolan T., Chen L., Madura K., Sweder K.S. Proteolysis of a nucleotide excision repair protein by the 26S proteasome // *Curr. Genet*.– 2002.– V. 42, (1).– P. 9–20.
64. Ng J.M.Y., Vermeulen W., Van der Horst G.T.J., Bergink S., Sugawara K., Vrieling H., Hoeijmakers J.H.J. A novel regulation mechanism of DNA repair by damage-induced and RAD23-dependent stabilization of xeroderma pigmentosum group C protein // *Genes Dev*.– 2003.– V. 17, (13).– P. 1630–1645.
65. Araki M., Masutani C., Takemura M., Uchida A., Sugawara K., Kondoh J., Ohkuma Y., Hanaoka F. Centrosome Protein Centrin 2/Caltractin 1 Is Part of the Xeroderma Pigmentosum Group C Complex That Initiates Global Genome Nucleotide Excision Repair // *J. Biol. Chem*.– 2001.– V. 276, (22).– P. 18665–18672.
66. Nishi R., Sakai W., Tone D., Hanaoka F., Sugawara K. Structure-function Analysis of the EF-hand Protein centrin-2 for Its Intracellular Localization and Nucleotide Excision Repair // *Mol. Cell. Biol*.– 2013.– P. 5664–5674.

67. Cheon N.Y., Kim H.S., Yeo J.E., Schärer O.D., Lee J.Y. Single-molecule visualization reveals the damage search mechanism for the human NER protein XPC-RAD23B // *Nucleic Acids Res.*— 2019.— V. 47, (16).— P. 8337–8347.
68. Chen X., Velmurugu Y., Zheng G., Park B., Shim Y., Kim Y., Liu L., Van Houten B., He C., Ansari A., Min J., Houten B. Van, He C., Ansari A., Min J., Van Houten B., He C., Ansari A., Min J., Houten B. Van, He C., Ansari A., Min J. Kinetic gating mechanism of DNA damage recognition by Rad4/XPC // *Nat. Commun.*— 2015.— V. 6.— P. 5849.
69. Hoogstraten D., Bergink S., Verbiest V.H.M., Luijsterburg M.S., Geverts B., Raams A., Dinant C., Hoeijmakers J.H.J., Vermeulen W., Houtsmuller A.B. Versatile DNA damage detection by the global genome nucleotide excision repair protein XPC // *J. Cell Sci.*— 2008.— V. 121, (17).— P. 2850–2859.
70. Reardon J.T., Sancar A. Recognition and repair of the cyclobutane thymine dimer, a major cause of skin cancers, by the human excision nuclease // *Genes Dev.*— 2003.— V. 17, (20).— P. 2539–2551.
71. Scrima A., Koníčková R., Czyzewski B.K., Kawasaki Y., Jeffrey P.D., Groisman R., Nakatani Y., Iwai S., Pavletich N.P., Thomä N.H. Structural Basis of UV DNA-Damage Recognition by the DDB1-DDB2 Complex // *Cell.*— 2008.— V. 135, (7).— P. 1213–1223.
72. Sugawara K., Okuda Y., Saijo M., Nishi R., Matsuda N., Chu G., Mori T., Iwai S., Tanaka K., Tanaka K., Hanaoka F. UV-induced ubiquitylation of XPC protein mediated by UV-DDB-ubiquitin ligase complex // *Cell.*— 2005.— V. 121, (3).— P. 387–400.
73. Fitch M.E., Nakajima S., Yasui A., Ford J.M. In Vivo Recruitment of XPC to UV-induced Cyclobutane Pyrimidine Dimers by the DDB2 Gene Product // *J. Biol. Chem.*— 2003.— V. 278, (47).— P. 46906–46910.
74. Wittschieben B., Iwai S., Wood R.D. DDB1-DDB2 (xeroderma pigmentosum group E) protein complex recognizes a cyclobutane pyrimidine dimer, mismatches, apurinic/apyrimidinic sites, and compound in DNA // *J. Biol. Chem.*— 2005.— V. 280, (48).— P. 39982–39989.
75. Fujiwara Y., Masutani C., Mizukoshi T., Kondo J., Hanaoka F., Iwai S. Characterization of DNA recognition by the human UV-damaged DNA-binding protein // *J. Biol. Chem.*— 1999.— V. 274, (28).— P. 20027–20033.
76. Liu Y., Reeves D., Kropachev K., Cai Y., Ding S., Kolbanovskiy M., Kolbanovskiy A., Bolton J.L., Broyde S., Van Houten B., Geacintov N.E. Probing for DNA damage with  $\beta$ -hairpins: Similarities in incision efficiencies of bulky DNA adducts by prokaryotic and human nucleotide excision repair systems in vitro // *DNA Repair (Amst.)*— 2011.— V. 10, (7).— P. 684–696.

77. Krasikova Y.S., Rechkunova N.I., Maltseva E.A., Pestryakov P.E., Petruseva I.O., Sugasawa K., Chen X., Min J.H., Lavrik O.I. Comparative analysis of interaction of human and yeast DNA damage recognition complexes with damaged DNA in nucleotide excision repair // *J. Biol. Chem.*– 2013.– V. 288, (15).– P. 10936–10947.
78. Camenisch U., Träutlein D., Clement F.C., Fei J., Leitenstorfer A., Ferrando-May E., Naegeli H. Two-stage dynamic DNA quality check by xeroderma pigmentosum group C protein // *EMBO J.*– 2009.– V. 28, (16).– P. 2387–2399.
79. Janićijević A., Sugasawa K., Shimizu Y., Hanaoka F., Wijgers N., Djurica M., Hoeijmakers J.H.J., Wyman C. DNA bending by the human damage recognition complex XPC-HR23B // *DNA Repair (Amst.)*– 2003.– V. 2, (3).– P. 325–336.
80. Mocquet V., Kropachev K., Kolbanovskiy M., Kolbanovskiy A., Tapias A., Cai Y., Broyde S., Geacintov N.E., Egly J.M. The human DNA repair factor XPC-HR23B distinguishes stereoisomeric benzo[a]pyrenyl-DNA lesions // *EMBO J.*– 2007.– V. 26, (12).– P. 2923–2932.
81. Mu H., Geacintov N.E., Broyde S., Yeo J.E., Schärer O.D. Molecular basis for damage recognition and verification by XPC-RAD23B and TFIIH in nucleotide excision repair // *DNA Repair (Amst.)*– 2018.– V. 71.– P. 33–42.
82. Egly J.M., Coin F. A history of TFIIH: Two decades of molecular biology on a pivotal transcription/repair factor // *DNA Repair (Amst.)*– 2011.– V. 10, (7).– P. 714–721.
83. Buterin T., Meyer C., Giese B., Naegeli H. DNA quality control by conformational readout on the undamaged strand of the double helix // *Chem. Biol.*– 2005.– V. 12, (8).– P. 913–922.
84. Sugasawa K., Akagi J. ichi, Nishi R., Iwai S., Hanaoka F. Two-Step Recognition of DNA Damage for Mammalian Nucleotide Excision Repair: Directional Binding of the XPC Complex and DNA Strand Scanning // *Mol. Cell.*– 2009.– V. 36, (4).– P. 642–653.
85. Nemzow L., Lubin A., Zhang L., Gong F. XPC: Going where no DNA damage sensor has gone before // *DNA Repair.*– 2015.– V. 36.– P. 19–27.
86. Reeves D.A., Mu H., Kropachev K., Cai Y., Ding S., Kolbanovskiy A., Kolbanovskiy M., Chen Y., Krzeminski J., Amin S., Patel D.J., Broyde S., Geacintov N.E. Resistance of bulky DNA lesions to nucleotide excision repair can result from extensive aromatic lesion-base stacking interactions // *Nucleic Acids Res.*– 2011.– V. 39, (20).– P. 8752–8764.
87. Yeo J.E., Khoo A., Fagbemi A.F., Schärer O.D. The efficiencies of damage recognition and excision correlate with duplex destabilization induced by acetylaminofluorene adducts in human nucleotide excision repair // *Chem. Res. Toxicol.*– 2012.– V. 25, (11).– P. 2462–2468.
88. Guthrie O.W., Li-Korotky H.S., Durrant J.D., Balaban C. Cisplatin induces cytoplasmic to nuclear translocation of nucleotide excision repair factors among spiral ganglion neurons // *Hear. Res.*– 2008.– V. 239, (1–2).– P. 79–91.

89. Wang Q.E., Zhu Q., Wani G., Chen J., Wani A.A. UV radiation-induced XPC translocation within chromatin is mediated by damaged-DNA binding protein, DDB2 // *Carcinogenesis*.– 2004.– V. 25, (6).– P. 1033–1043.
90. Evdokimov A.N., Tsidulko A.Y., Popov A. V., Vorobiev Y.N., Lomzov A.A., Koroleva L.S., Silnikov V.N., Petrusheva I.O., Lavrik O.I. Structural basis for the recognition and processing of DNA containing bulky lesions by the mammalian nucleotide excision repair system // *DNA Repair (Amst)*.– 2018.– V. 61, (October).– P. 86–98.
91. Volker M., Moné M.J., Karmakar P., Van Hoffen A., Schul W., Vermeulen W., Hoeijmakers J.H.J., Van Driel R., Van Zeeland A.A., Mullenders L.H.F. Sequential assembly of the nucleotide excision repair factors in vivo // *Mol. Cell*.– 2001.– V. 8, (1).– P. 213–224.
92. Araújo S.J., Nigg E.A., Wood R.D. Strong Functional Interactions of TFIIH with XPC and XPG in Human DNA Nucleotide Excision Repair, without a Preassembled Repairoosome // *Mol. Cell. Biol*.– 2001.– V. 21, (7).– P. 2281–2291.
93. Kokic G., Chernev A., Tegunov D., Dienemann C., Urlaub H., Cramer P. Structural basis of TFIIH activation for nucleotide excision repair // *Nat. Commun*.– 2019.– V. 10, (1).– P. 1–9.
94. Schultz P., Fribourg S., Poterszman A., Mallouh V., Moras D., Egly J.M. Molecular structure of human TFIIH // *Cell*.– 2000.– V. 102, (5).– P. 599–607.
95. Oksenyich V., Coin F. The long unwinding road: XPB and XPD helicases in damaged DNA opening // *Cell Cycle*.– 2010.– V. 9, (1).– P. 90–96.
96. Coin F., Oksenyich V., Egly J.M. Distinct Roles for the XPB/p52 and XPD/p44 Subcomplexes of TFIIH in Damaged DNA Opening during Nucleotide Excision Repair // *Mol. Cell*.– 2007.– V. 26, (2).– P. 245–256.
97. Kuper J., Braun C., Elias A., Michels G., Sauer F., Schmitt D.R., Poterszman A., Egly J.M., Kisker C. In TFIIH, XPD Helicase Is Exclusively Devoted to DNA Repair // *PLoS Biol*.– 2014.– V. 12, (9).– e1001954.
98. Oksenyich V., De Jesus B.B., Zhovmer A., Egly J.M., Coin F. Molecular insights into the recruitment of TFIIH to sites of DNA damage // *EMBO J*.– 2009.– V. 28, (19).– P. 2971–2980.
99. Abdulrahman W., Iltis I., Radu L., Braun C., Maglott-Roth A., Giraudon C., Egly J.M., Poterszman A. ARCH domain of XPD, an anchoring platform for CAK that conditions TFIIH DNA repair and transcription activities // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*.– 2013.– V. 110, (8).– e633.
100. Coin F., Oksenyich V., Mocquet V., Groh S., Blattner C., Egly J.M. Nucleotide Excision Repair Driven by the Dissociation of CAK from TFIIH // *Mol. Cell*.– 2008.– V. 31, (1).– P. 9–20.
101. Fan L. How two helicases work together within the TFIIH complex, a perspective from structural studies of XPB and XPD helicases // *Frontiers in Biology*.– 2013.– V. 8, (4).– P. 363–368.

102. Lafrance-Vanasse J., Arseneault G.V., Cappadocia L., Legault P., Omichinski J.G. Structural and functional evidence that Rad4 competes with Rad2 for binding to the Tfb1 subunit of TFIIH in NER // *Nucleic Acids Res.*– 2013.– V. 41, (4).– P. 2736–2745.
103. Kölmel W. Structural and functional characterization of TFIIH from *Chaetomium thermophilum* Strukturelle und funktionale Charakterisierung von TFIIH aus *Chaetomium thermophilum*.– 2017.– 263 p.
104. Tirode F., Busso D., Coin F., Egly J.M. Reconstitution of the transcription factor TFIIH: Assignment of functions for the three enzymatic subunits, XPB, XPD, and cdk7 // *Mol. Cell.*– 1999.– V. 3, (1).– P. 87–95.
105. Fan L., Fuss J.O., Cheng Q.J., Arvai A.S., Hammel M., Roberts V.A., Cooper P.K., Tainer J.A. XPD Helicase Structures and Activities: Insights into the Cancer and Aging Phenotypes from XPD Mutations // *Cell.*– 2008.– V. 133, (5).– P. 789–800.
106. Wolski S.C., Kuper J., Hanzelmann P., Truglio J.J., Croteau D.L., Houten B. Van, Kisker C., Hanzelmann P., Truglio J.J., Croteau D.L., Van Houten B., Kisker C., Hanzelmann P., Truglio J.J., Croteau D.L., Houten B. Van, Kisker C. Crystal Structure of the FeS Cluster – Containing Nucleotide Excision Repair Helicase XPD // *PLoS Biol.*– 2008.– V. 6, (6).– P. 1332–1342.
107. Kuper J., Wolski S.C., Michels G., Kisker C. Functional and structural studies of the nucleotide excision repair helicase XPD suggest a polarity for DNA translocation // *EMBO J.*– 2012.– V. 31, (2).– P. 494–502.
108. Peissert S., Sauer F., Grabarczyk D.B., Braun C., Sander G., Poterszman A., Egly J.M., Kuper J., Kisker C. In TFIIH the Arch domain of XPD is mechanistically essential for transcription and DNA repair // *Nat. Commun.*– 2020.– V. 11, (1).– P. 1667.
109. Mathieu N., Kaczmarek N., Rüthemann P., Luch A., Naegeli H. DNA quality control by a lesion sensor pocket of the xeroderma pigmentosum group D helicase subunit of TFIIH // *Curr. Biol.*– 2013.– V. 23, (3).– P. 204–212.
110. Mathieu N., Kaczmarek N., Naegeli H. Strand- and site-specific DNA lesion demarcation by the xeroderma pigmentosum group D helicase // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*– 2010.– V. 107, (41).– P. 17545–17550.
111. Houten B. Van, Kuper J., Kisker C. Role of XPD in cellular functions: To TFIIH and beyond // *DNA Repair.*– 2016.– V. 44.– P. 136–142.
112. Rudolf J., Rouillon C., Schwarz-Linek U., White M.F. The helicase XPD unwinds bubble structures and is not stalled by DNA lesions removed by the nucleotide excision repair pathway // *Nucleic Acids Res.*– 2009.– V. 38, (3).– P. 931–941.

113. Luo J., Cimermancic P., Viswanath S., Ebmeier C.C., Kim B., Dehecq M., Raman V., Greenberg C.H., Pellarin R., Sali A., Taatjes D.J., Hahn S., Ranish J. Architecture of the Human and Yeast General Transcription and DNA Repair Factor TFIIH // *Mol. Cell.*– 2015.– V. 59, (5).– P. 794–806.
114. Gilljam K.M., Müller R., Liabakk N.B., Otterlei M. Nucleotide Excision Repair Is Associated with the Replisome and Its Efficiency Depends on a Direct Interaction between XPA and PCNA // *PLoS One.*– 2012.– V. 7, (11).– e49199.
115. Sugitani N., Sivley R.M., Perry K.E., Capra J.A., Chazin W.J. XPA: A key scaffold for human nucleotide excision repair // *DNA Repair.*– 2016.– V. 44.– P. 123–135.
116. Hey T., Lipps G., Sugasawa K., Iwai S., Hanaoka F., Krauss G. The XPC-HR23B Complex Displays High Affinity and Specificity for Damaged DNA in a True-Equilibrium Fluorescence Assay // *Biochemistry.*– 2002.– V. 41.– P. 6583–6587.
117. Patrick S.M., Turchi J.J. Xeroderma pigmentosum complementation group A protein (XPA) modulates RPA-DNA interactions via enhanced complex stability and inhibition of strand separation activity // *J. Biol. Chem.*– 2002.– V. 277, (18).– P. 16096–16101.
118. Camenisch U., Dip R., Vitanescu M., Naegeli H. group A. protein is driven to nucleotide excision repair sites by the electrostatic potential of distorted D. Xeroderma pigmentosum complementation group A protein is driven to nucleotide excision repair sites by the electrostatic potential of distorted DNA // *DNA Repair (Amst).*– 2007.– V. 6, (12).– P. 1819–1828.
119. Buchko G.W., Isern N.G., Spicer L.D., Kennedy M.A. Human nucleotide excision repair protein XPA: NMR spectroscopic studies of an XPA fragment containing the ERCC1-binding region and the minimal DNA-binding domain (M59-F219) // *Mutat. Res.*– 2001.– V. 486, (1).– P. 1–10.
120. Li C.L., Golebiowski F.M., Onishi Y., Samara N.L., Sugasawa K., Yang W. Tripartite DNA Lesion Recognition and Verification by XPC, TFIIH, and XPA in Nucleotide Excision Repair // *Mol. Cell.*– 2015.– V. 59, (6).– P. 1025–1034.
121. Chen R., Wold M.S. Replication protein A: Single-stranded DNA's first responder: Dynamic DNA-interactions allow replication protein A to direct single-strand DNA intermediates into different pathways for synthesis or repair // *BioEssays.*– 2014.– V. 36, (12).– P. 1156–1161.
122. De Laat W.L., Appeldoorn E., Sugasawa K., Weterings E., Jaspers N.G.J., Hoeijmakers J.H.J. DNA-binding polarity of human replication protein A positions nucleases in nucleotide excision repair // *Genes Dev.*– 1998.– V. 12, (16).– P. 2598–2609.
123. Пестряков П., Лаврик О. Механизмы Функционирования SSB Белков В Процесах Клеточного Метаболизма ДНК // *Успехи биологической химии.*– 2008.– Т. 48.– С. 65–104.
124. Kolpashchikov D., Khodyreva S., Khlimankov D., Wold M., Favre A., Lavrik O. Polarity of human replication protein A binding to DNA // *Nucleic Acids Res.*– 2001.– V. 29, (2).– P. 373–379.

125. Mason A.C., Roy R., Simmons D.T., Wold M.S. Functions of alternative replication protein A in initiation and elongation // *Biochemistry*.– 2010.– V. 49, (28).– P. 5919–5928.
126. Zotter A., Luijsterburg M.S., Warmerdam D.O., Ibrahim S., Nigg A., van Cappellen W.A., Hoeijmakers J.H.J., van Driel R., Vermeulen W., Houtsmuller A.B. Recruitment of the Nucleotide Excision Repair Endonuclease XPG to Sites of UV-Induced DNA Damage Depends on Functional TFIIH // *Mol. Cell. Biol.*– 2006.– V. 26, (23).– P. 8868–8879.
127. Park C.H., Sancar A. Formation of a ternary complex by human XPA, ERCC1, and ERCC4(XPF) excision repair proteins // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*– 1994.– V. 91, (11).– P. 5017–5021.
128. Staresincic L., Fagbemi A.F., Enzlin J.H., Gourdin A.M., Wijgers N., Dunand-Sauthier I., Giglia-Mari G., Clarkson S.G., Vermeulen W., Schärer O.D. Coordination of dual incision and repair synthesis in human nucleotide excision repair // *EMBO J.*– 2009.– V. 28, (8).– P. 1111–1120.
129. Li L., Elledge S.J., Peterson C.A., Bales E.S., Legerski R.J. Specific association between the human DNA repair proteins XPA and ERCC1 // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*– 1994.– V. 91, (11).– P. 5012–5016.
130. Hohl M., Dunand-Sauthier I., Staresincic L., Jaquier-Gubler P., Fabrizio T., Modesti M., Clarkson S.G., Scharer O.D. Domain swapping between FEN-1 and XPG defines regions in XPG that mediate nucleotide excision repair activity and substrate specificity // *Nucleic Acids Res.*– 2007.– V. 35, (9).– P. 3053–3063.
131. Grasby J.A., Finger L.D., Tsutakawa S.E., Atack J.M., Tainer J.A. Unpairing and gating: Sequence-independent substrate recognition by FEN superfamily nucleases // *Trends in Biochemical Sciences*.– 2012.– V. 37, (2).– P. 74–84.
132. Kemp M.G., Reardon J.T., Lindsey-Boltz L.A., Sancar A. Mechanism of release and fate of excised oligonucleotides during nucleotide excision repair // *J. Biol. Chem.*– 2012.– V. 287, (27).– P. 22889–22899.
133. Kemp M.G., Hu J. PostExcision Events in Human Nucleotide Excision Repair // *Photochemistry and Photobiology*.– 2017.– V. 93, (1).– P. 178–191.
134. Araújo S., Tirode F., Coin F., Pospiech H. Nucleotide excision repair of DNA with recombinant human proteins: definition of the minimal set of factors, active forms of TFIIH, and modulation by CAK // *Genes Dev.*– 2000.– V. 14, (3).– P. 349–359.
135. Lehmann A.R. DNA polymerases and repair synthesis in NER in human cells // *DNA Repair*.– 2011.– V. 10, (7).– P. 730–733.
136. Ogi T., Lehmann A.R. The Y-family DNA polymerase  $\kappa$  (pol  $\kappa$ ) functions in mammalian nucleotide-excision repair // *Nat. Cell Biol.*– 2006.– V. 8, (6).– P. 640–642.

137. Ogi T., Limsirichaikul S., Overmeer R.M., Volker M., Takenaka K., Cloney R., Nakazawa Y., Niimi A., Miki Y., Jaspers N.G., Mullenders L.H.F., Yamashita S., Foustari M.I., Lehmann A.R. Three DNA Polymerases, Recruited by Different Mechanisms, Carry Out NER Repair Synthesis in Human Cells // *Mol. Cell.*– 2010.– V. 37, (5).– P. 714–727.
138. Schärer O.D. Chemistry and Biology of DNA Repair // *Angew. Chem. Int. Ed.*– 2003.– V. 42.– P. 2946–2974.
139. Moser J., Kool H., Giakzidis I., Caldecott K., Mullenders L.H.F., Foustari M.I. Sealing of Chromosomal DNA Nicks during Nucleotide Excision Repair Requires XRCC1 and DNA Ligase III $\alpha$  in a Cell-Cycle-Specific Manner // *Mol. Cell.*– 2007.– V. 27, (2).– P. 311–323.
140. Jacobs A.L., Schär P. DNA glycosylases: In DNA repair and beyond // *Chromosoma.*– 2012.– V. 121, (1).– P. 1–20.
141. Ignatov A. V., Bondarenko K.A., Makarova A. V. Non-bulky lesions in human DNA: The ways of formation, repair, and replication // *Acta Naturae.*– 2017.– V. 9, (3).– P. 12–26.
142. Almeida K.H., Sobol R.W. A unified view of base excision repair: lesion-dependent protein complexes regulated by post-translational modification // *DNA Repair (Amst).*– 2007.– V. 6, (6).– P. 695–711.
143. Li M., Wilson D.M. Human Apurinic/Apyrimidinic endonuclease 1 // *Antioxidants and Redox Signaling.*– 2014.– V. 20, (4).– P. 678–707.
144. Drohat A., Maiti A. Mechanisms for enzymatic cleavage of the N-glycosidic bond in DNA // *Org Biomol Chem.*– 2016.– V. 12, (42).– P. 8367–8378.
145. Wallace S.S., Murphy D.L., Sweasy J.B. Base excision repair and cancer // *Cancer Lett.*– 2012.– V. 327, (1–2).– P. 73–89.
146. Krokan H., Bjøra M. Base Excision Repair // *Cold Spring Harb. Lab. Press.*– 2013.– V. 5.– a012583.
147. Lindahl T., Nyberg B. Rate of Depurination of Native Deoxyribonucleic Acid // *Biochemistry.*– 1972.– V. 11, (19).– P. 3610–3618.
148. Lindahl T. Instability and decay if the primary structure of DNA // *Nature.*– 1993.– V. 363.– P. 709–714.
149. Nakamura J., Swenberg J.A. Endogenous apurinic/aprimidinic sites in genomic DNA of mammalian tissues // *Cancer Res.*– 1999.– V. 59, (11).– P. 2522–2526.
150. Wallace S.S. Base excision repair: A critical player in many games // *DNA Repair (Amst).*– 2009.– V. 19.– P. 14–26.
151. Eccles L.J., O'Neill P., Lomax M.E. Delayed repair of radiation induced clustered DNA damage: Friend or foe? // *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.*– 2011.– V. 711, (1–2).– P. 134–141.

152. Sage E., Shikazono N. Radiation-induced clustered DNA lesions: Repair and mutagenesis // *Free Radic. Biol. Med.*– 2017.– V. 107.– P. 125–135.
153. Stewart R.D., Ackerman E.J. Monte Carlo Simulation of Base and Nucleotide Excision Repair of Clustered DNA Damage Sites // *Radiat. Res.*– 2005.– V. 164, (2).– P. 180–193.
154. Goodhead D.T. Initial Events in the Cellular Effects of Ionizing-Radiations - Clustered Damage in Dna // *Int. J. Radiat. Biol.*– 1994.– V. 65, (1).– P. 7–17.
155. David-Cordonnier M.H., Cunniffe S.M.T., Hickson I.D., O'Neill P. Efficiency of incision of an AP site within clustered DNA damage by the major human AP endonuclease // *Biochemistry.*– 2002.– V. 41, (2).– P. 634–642.
156. Cadet J., Ravanat J.L., TavernaPorro M., Menoni H., Angelov D. Oxidatively generated complex DNA damage: Tandem and clustered lesions // *Cancer Lett.*– 2012.– V. 327, (1–2).– P. 5–15.
157. Lomax M.E., Cunniffe S., O'Neill P. Efficiency of repair of an abasic site within DNA clustered damage sites by mammalian cell nuclear extracts // *Biochemistry.*– 2004.– V. 43, (34).– P. 11017–11026.
158. Kozmin S.G., Sedletska Y., Reynaud-Angelin A., Gasparutto D., Sage E. The formation of double-strand breaks at multiply damaged sites is driven by the kinetics of excision/incision at base damage in eukaryotic cells // *Nucleic Acids Res.*– 2009.– V. 37, (6).– P. 1767–1777.
159. Malyarchuk S., Castore R., Harrison L. Apex1 can cleave complex clustered DNA lesions in cells // *DNA Repair (Amst).*– 2009.– V. 8, (12).– P. 1343–1354.
160. Malyarchuk S., Harrison L. DNA repair of clustered uracils in HeLa cells // *J. Mol. Biol.*– 2005.– V. 345, (4).– P. 731–743.
161. Noguchi M., Urushibara A., Yokoya A., O'Neill P., Shikazono N. The mutagenic potential of 8-oxoG/single strand break-containing clusters depends on their relative positions // *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.*– 2012.– V. 732, (1–2).– P. 34–42.
162. Georgakilas A.G., Bennett P. V., Wilson D.M., Sutherland B.M. Processing of bistranded abasic DNA clusters in  $\gamma$ -irradiated human hematopoietic cells // *Nucleic Acids Res.*– 2004.– V. 32, (18).– P. 5609–5620.
163. Jackson S.P., Bartek J. The DNA-damage response in human biology and disease // *Nature.*– 2010.– V. 461, (7267).– P. 1071–1078.
164. Aziz K., Newsheer S., Pantelias G., Iliakis G., Gorgoulis V.G., Georgakilas A.G. Targeting DNA damage and repair: Embracing the pharmacological era for successful cancer therapy // *Pharmacol. Ther.*– 2012.– V. 133, (3).– P. 334–350.
165. Hoeijmakers J. DNA Damage, Aging, and Cancer // *N. Engl. J. Med.*– 2009.– V. 361.– P. 1475–1485.

166. Friedberg E., Aguilera A., Gellert M., Hanawalt P., Hays J., Lehmann A., Lindahl T., Lowndes N. DNA repair: From molecular mechanism to human disease article // *DNA Repair (Amst).*– 2006.– V. 5.– P. 986–996.
167. Kabzinski J., Mucha B., Cuchra M., Markiewicz L., Przybylowska K., Dziki A., Dziki L., Majsterek I. Efficiency of Base Excision Repair of Oxidative DNA Damage and Its Impact on the Risk of Colorectal Cancer in the Polish Population // *Oxid. Med. Cell. Longev.*– 2016.– 3125989.
168. Promislow D.E.L. DNA repair and the evolution of longevity: A critical analysis // *J. Theor. Biol.*– 1994.– V. 170, (3).– P. 291–300.
169. Hanawalt P.C. Emerging Links Between Premature Ageing and Defective DNA Repair // *Mech Ageing Dev.*– 2009.– V. 129, (7).– P. 503–505.
170. Kogan V., Molodtsov I., Menshikov L.I., Reis R.J.S., Fedichev P. Stability analysis of a model gene network links aging, stress resistance, and negligible senescence // *Sci. Rep.*– 2015.– V. 5.– P. 1–12.
171. Barnes D.E., Lindahl T. Repair and Genetic Consequences of Endogenous DNA Base Damage in Mammalian Cells // *Annu. Rev. Genet.*– 2004.– V. 38, (1).– P. 445–476.
172. Caldecott K.W. Single-strand break repair and genetic disease // *Nat. Rev. Genet.*– 2008.– V. 9, (8).– P. 619–631.
173. Vilenchik M.M., Knudson A.G. Endogenous DNA double-strand breaks: Production, fidelity of repair, and induction of cancer // *Proc. Natl. Acad. Sci.*– 2003.– V. 100, (22).– P. 12871–12876.
174. Lindahl T. DNA repair enzymes. // *Annu Rev Biochem.*– 1982.– V. 51.– P. 61–87.
175. Lindahl T., Barnes D.E. Repair of endogenous DNA damage // *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*– 2000.– V. 65.– P. 127–133.
176. Helbock H.J., Beckman K.B., Shigenaga M.K., Walter P.B., Woodall A.A., Yeo H.C. A.B.N. DNA oxidation matters: The HPLC–electrochemical detection assay of 8-oxo-deoxyguanosine and 8-oxo-guanine // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*– 1997.– V. 95.– P. 288–293.
177. van Loon B., Markkanen E., Hübscher U. Oxygen as a friend and enemy: How to combat the mutational potential of 8-oxo-guanine // *DNA Repair (Amst).*– 2010.– V. 9, (6).– P. 604–616.
178. Poirier M.C. DNA adducts as exposure biomarkers and indicators of cancer risk // *Environ. Health Perspect.*– 1997.– V. 105, (4).– P. 907–912.
179. Weston A., Bowman E.D. Fluorescence detection of benzo[a]pyrene-DNA adducts in human lung // *Carcinogenesis.*– 1991.– V. 12, (8).– P. 1445–1449.
180. Collins A., Gedik C., Vaughan N., Wood S., White A., Dubois J., Rees J.F., et al. Measurement of DNA oxidation in human cells by chromatographic and enzymic methods // *Free Radic. Biol. Med.*– 2003.– V. 34, (8).– P. 1089–1099.

181. Gedik C.M., Collins A., Loft S., Poulsen H., Riis B., Cadet J., Douki T., et al. Establishing the background level of base oxidation in human lymphocyte DNA: results of an interlaboratory validation study // *FASEB J.*– 2004.– V. 23.– P. 1–23.
182. Gudmundsson B., Thormar H.G., Sigurdsson A., Dankers W., Steinarsdottir M., Hermanowicz S., Sigurdsson S., et al. Northern lights assay: a versatile method for comprehensive detection of DNA damage // *Nucleic Acids Res.*– 2018.– V. 46, (20).– e118.
183. Baek S., Han S., Kang D., Kemp M.G., Choi J.H. Simultaneous detection of nucleotide excision repair events and apoptosis-induced DNA fragmentation in genotoxin-treated cells // *Sci. Rep.*– 2018.– V. 8, (1).– P. 1–11.
184. Sykora P., Witt K.L., Revanna P., Smith-Roe S.L., Dismukes J., Lloyd D.G., Engelward B.P., Sobol R.W. Next generation high throughput DNA damage detection platform for genotoxic compound screening // *Sci. Rep.*– 2018.– V. 8, (1).– 2771.
185. Cemeli E., Baumgartner A., Anderson D. Antioxidants and the Comet assay // *Mutat. Res. - Rev. Mutat. Res.*– 2009.– V. 681, (1).– P. 51–67.
186. Evdokimov A., Petruseva I., Tsidulko A., Koroleva L., Serpokrylova I., Silnikov V., Lavrik O. New synthetic substrates of mammalian nucleotide excision repair system // *Nucleic Acids Res.*– 2013.– V. 41, (12).– e123.
187. Choi J.H., Gaddameedhi S., Kim S.Y., Hu J., Kemp M.G., Sancar A. Highly specific and sensitive method for measuring nucleotide excision repair kinetics of ultraviolet photoproducts in human cells // *Nucleic Acids Res.*– 2014.– V. 42, (4).– P. 1–11.
188. Shen J.C., Fox E.J., Ahn E.H., Loeb L.A. A rapid assay for measuring nucleotide excision repair by oligonucleotide retrieval // *Sci. Rep.*– 2014.– V. 4.– P. 1–10.
189. Jia N., Nakazawa Y., Guo C., Shimada M., Sethi M., Takahashi Y., Ueda H., Nagayama Y., Ogi T. A rapid, comprehensive system for assaying DNA repair activity and cytotoxic effects of DNA-damaging reagents // *Nat. Protoc.*– 2015.– V. 10, (1).– P. 12–24.
190. Iii D.M.W., Sobol R.W. DNA Repair Molecular Beacon assay : a platform for real-time functional analysis of cellular DNA repair capacity // *Oncotarget.*– 2018.– V. 9, (251).– P. 31719–31743.
191. Rogozin I.B., Pavlov Y.I. Theoretical analysis of mutation hotspots and their DNA sequence context specificity // *Mutat. Res. - Rev. Mutat. Res.*– 2003.– V. 544, (1).– P. 65–85.
192. Martincorena I., Roshan A., Gerstung M., Ellis P., Van Loo P., McLaren S., Wedge D.C., Fullam A., Alexandrov L.B., Tubio J.M., Stebbings L., Menzies A., Widaa S., Stratton M.R., Jones P.H., Campbell P.J. High burden and pervasive positive selection of somatic mutations in normal human skin // *Science.*– 2015.– V. 348, (6237).– P. 880–886.

193. Alexandrov L.B., Nik-Zainal S., Wedge D.C., Aparicio S.A.J.R., Behjati S., Biankin A. V., Bignell G.R., et al. Signatures of mutational processes in human cancer // *Nature*.– 2013.– V. 500, (7463).– P. 415–421.
194. Almaqwashi A., Paramanathan T., Rouzina I., Williams M. Mechanisms of small molecule–DNA interactions probed by single-molecule force spectroscopy // *Nucleic Acids Res.*– 2016.– V. 44, (9).– P. 3971–3988.
195. Eckel R., Ros R., Ros A., Wilking S.D., Sewald N., Anselmetti D. Identification of binding mechanisms in single molecule-DNA complexes // *Biophys. J.*– 2003.– V. 85, (3).– P. 1968–1973.
196. Krautbauer R., Pope L.H., Schrader T.E., Allen S., Gaub H.E. Discriminating small molecule DNA binding modes by single molecule force spectroscopy // *FEBS Lett.*– 2002.– V. 510, (3).– P. 154–158.
197. Gates K.S. The Chemical Reactions of DNA Damage and Degradation // *Reviews of Reactive Intermediate Chemistry*.– 2007.– P. 333–368.
198. Hargis J., Schaefer H., Houk K., S. W. Non-Covalent Interactions of a Benzo[a]pyrene Diol Epoxide with DNA Base Pairs: Insight into the Formation of Adducts of (+)-BaP DE-2 with DNA // *J Phys Chem A*.– 2010.– V. 8, (24).– P. 4017–4018.
199. Eaton D.L., Gallagher E.P. Mechanisms of Aflatoxin Carcinogenesis // *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*– 1994.– V. 34, (1).– P. 135–172.
200. Romano L., Vooradi V. Effect of N-2-Acetylaminofluorene and 2-Aminofluorene Adducts on DNA Binding and Synthesis by Yeast DNA Polymerase  $\eta$ † // *Biochemistry*.– 2010.– V. 38, (3).– P. 319–335.
201. Hemminki K., Thilly W.G. Binding of cisplatin to specific sequences of human DNA in vitro // *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.*– 1988.– V. 202, (1).– P. 133–138.
202. Gates K.S. An Overview of Chemical Processes That Damage Cellular DNA: Spontaneous Hydrolysis, Alkylation, and Reactions with Radicals // *Chem Res Toxicol.*– 2009.– V. 22, (11).– P. 1747–1760.
203. Starostenko L. V, Maltseva E.A., Lebedeva N.A., Pestryakov P.E., Lavrik O.I., Rechkunova N.I. Interaction of Nucleotide Excision Repair Protein XPC – RAD23B with DNA Containing Benzo [ a ] pyrene Derived Adduct and Apurinic / Apyrimidinic Site within a Cluster // *Biochem. (Mosc)*.– 2016.– V. 81, (3).– P. 233–241.
204. Takata H., Hanafusa T., Mori T., Shimura M., Iida Y., Ishikawa K., Yoshikawa K., Yoshikawa Y., Maeshima K. Chromatin Compaction Protects Genomic DNA from Radiation Damage // *PLoS One*.– 2013.– V. 8, (10).– e75622.
205. Ljungman M., Hanawalt P.C. Efficient protection against oxidative DNA damage in chromatin // *Mol. Carcinog.*– 1992.– V. 5, (4).– P. 264–269.

206. Falk M., Lukášová E., Kozubek S. Chromatin structure influences the sensitivity of DNA to  $\gamma$ -radiation // *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.*– 2008.– V. 1783, (12).– P. 2398–2414.
207. Kumar R., Horikoshi N., Singh M., Gupta A., Misra H.S., Albuquerque K., Hunt C.R., Pandita T.K. Chromatin modifications and the DNA damage response to ionizing radiation // *Front. Oncol.*– 2013.– V. 2.– P. 214.
208. Mohamad O., Sishc B.J., Saha J., Pompos A., Rahimi A., Story M.D., Davis A.J., Kim D.W.N. Carbon ion radiotherapy: A review of clinical experiences and preclinical research, with an emphasis on DNA damage/repair // *Cancers (Basel)*.– 2017.– V. 9, (6).– P. 1–30.
209. Regulus P., Duroux B., Bayle P.A., Favier A., Cadet J., Ravanat J.L. Oxidation of the sugar moiety of DNA by ionizing radiation or bleomycin could induce the formation of a cluster DNA lesion // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*– 2007.– V. 104, (35).– P. 14032–14037.
210. Grivennikov S.I., Greten F.R., Karin M. Immunity, Inflammation, and Cancer // *Cell*.– 2010.– V. 140, (6).– P. 883–899.
211. Whitaker A.M., Schaich M.A., Smith M.R., Flynn T.S., Freudenthal B.D. Base excision repair of oxidative DNA damage: from mechanism to disease. // *Front. Biosci. (Landmark Ed.)*– 2017.– V. 22.– P. 1493–1522.
212. D’Errico M., Parlanti E., Pascucci B., Fortini P., Baccarini S., Simonelli V., Dogliotti E. Single nucleotide polymorphisms in DNA glycosylases: From function to disease // *Free Radic. Biol. Med.*– 2017.– V. 107.– P. 278–291.
213. Iida T. Accumulation of 8-oxo-2'-deoxyguanosine and increased expression of hMTH1 protein in brain tumors // *Neuro. Oncol.*– 2001.– V. 3, (2).– P. 73–81.
214. Ward J.F. DNA Damage as the Cause of Ionizing Radiation-Induced Gene Activation // *Radiat. Res.*– 1994.– V. 138, (1).– P. S85.
215. Cannan W.J., Pederson D.S. Mechanisms and Consequences of Double-Strand DNA Break Formation in Chromatin // *J. Cell. Physiol.*– 2016.– V. 231, (1).– P. 3–14.
216. Sutherland B.M., Bennett P. V, Sidorkina O., Laval J. Clustered DNA damages induced in isolated DNA and in human cells by low doses of ionizing radiation // *Mutagenesis*.– 2000.– V. 97, (1).– P. 247–261.
217. Gulston M., de Lara C., Jenner T., Davis E., O’Neill P. Processing of clustered DNA damage generates additional double-strand breaks in mammalian cells post-irradiation // *Nucleic Acids Res.*– 2004.– V. 32, (4).– P. 1602–1609.
218. Chen J., Stubbe J.A. Bleomycins: Towards better therapeutics // *Nat. Rev. Cancer*.– 2005.– V. 5, (2).– P. 102–112.
219. Nickoloff J.A., Sharma N., Taylor L. Clustered DNA double-strand breaks: Biological effects and relevance to cancer radiotherapy // *Genes*.– 2020.– V. 11, (1).– P. 99.

220. Smith B.L., Bauer G.B., Povirk L.F. DNA damage induced by bleomycin, neocarzinostatin, and melphalan in a precisely positioned nucleosome. Asymmetry in protection at the periphery of nucleosome-bound DNA // *J. Biol. Chem.*– 1994.– V. 269, (48).– P. 30587–30594.
221. Reinert T., Serodio C., Nunes F., Alves A., Scheliga S. Bleomycin-Induced Lung Injury // *J. Cancer Res.*– 2013.– P. 1–9.
222. Ramotar D., Wang H. Protective mechanisms against the antitumor agent bleomycin: Lessons from *Saccharomyces cerevisiae* // *Current Genetics.*– 2003.– V. 43, (4).– P. 213–224.
223. Cai Y., Geacintov N.E., Broyde S. Nucleotide excision repair efficiencies of bulky carcinogen-DNA adducts are governed by a balance between stabilizing and destabilizing interactions // *Biochemistry.*– 2012.– V. 51, (7).– P. 1486–1499.
224. Kusakabe M., Onishi Y., Tada H., Kurihara F., Kusao K., Furukawa M., Iwai S., Yokoi M., Sakai W., Sugawara K. Mechanism and regulation of DNA damage recognition in mammalian nucleotide excision repair // *Genes Environ.*– 2019.– V. 41, (1).– 2.
225. Starostenko L. V., Rechkunova N.I., Lebedeva N.A., Kolbanovskiy A., Geacintov N.E., Lavrik O.I. Human DNA polymerases catalyze lesion bypass across benzo[a]pyrene-derived DNA adduct clustered with an abasic site // *DNA Repair (Amst).*– 2014.– V. 24.– P. 1–9.
226. Geacintov N.E., Broyde S. Repair-Resistant DNA Lesions // *Chem Res Toxicol.*– 2017.– V. 30.– P. 1517–1548.
227. Cosman M., Fiala R., Hingerty B.E., Amin S., Geacintov N.E., Broyde S., Patel D.J. Solution conformation of the (+)-cis-anti-[BP]dG adduct opposite a deletion site in a DNA duplex: Intercalation of the covalently attached benzo[a]pyrene into the helix with base displacement of the modified deoxyguanosine into the minor groove // *Biochemistry.*– 1994.– V. 33, (38).– P. 11518–11527.
228. Sassa A., Kamoshita N., Kanemaru Y., Honma M., Yasui M. Xeroderma Pigmentosum Group A Suppresses Mutagenesis Caused by Clustered Oxidative DNA Adducts in the Human Genome // *PLoS One.*– 2015.– V. 10, (11).– e0142218.
229. Roche Y., Zhang D., Segers-Nolten G.M.J., Vermeulen W., Wyman C., Sugawara K., Hoeijmakers J., Otto C. Fluorescence correlation spectroscopy of the binding of nucleotide excision repair protein XPC-hHr23B with DNA substrates // *J. Fluoresc.*– 2008.– V. 18, (5).– P. 987–995.
230. Lee Y.C., Cai Y., Mu H., Broyde S., Amin S., Chen X., Min J.H., Geacintov N.E. The relationships between XPC binding to conformationally diverse DNA adducts and their excision by the human NER system: Is there a correlation? // *DNA Repair (Amst).*– 2014.– V. 19. – P. 55–63.
231. Shimizu Y., Uchimura Y., Dohmae N., Saitoh H., Hanaoka F., Sugawara K. Stimulation of DNA glycosylase activities by XPC protein complex: Roles of protein-protein interactions // *J. Nucleic Acids.*– 2010.– 805698.

232. Guggenheim E.R., Xu D., Zhang C.X., Chang P. V., Lippard S.J. Photoaffinity isolation and identification of proteins in cancer cell extracts that bind to platinum-modified DNA // *ChemBioChem.*– 2009.– V. 10, (1).– P. 141–157.
233. Kropachev K., Kolbanovskii M., Caib Y., Rodríguez F., Geacintova N.E., Kropachev K., Kolbanovskii M., Cai Y., Rodríguez F., Kolbanovskii A., Liu Y., Zhang L., Amin S., Patel D., Broyde S., Geacintov N.E. The Sequence Dependence of Human Nucleotide Excision Repair Efficiencies of Benzo[a]pyrene-Derived DNA Lesions: Insights into the Structural Factors that Favor Dual Incisions // *J. Mol. Biol.*– 2009.– V. 386, (5).– P. 1193–1203.
234. Mu D., Tursun M., Duckett D.R., Drummond J.T., Modrich P., Sancar A. Recognition and repair of compound DNA lesions (base damage and mismatch) by human mismatch repair and excision repair systems. // *Mol. Cell. Biol.*– 1997.– V. 17, (2).– P. 760–769.
235. Biggerstaff M., Robins P., Coverly D., Wood R.D. Effect of exogenous DNA fragments on human cell extract-mediated DNA repair synthesis // *Mutat. Res. - DNA Repair.*– 1991.– V. 254, (3).– P. 217–224.
236. Geacintov N.E., Broyde S., Buterin T., Naegeli H., Wu M., Yan S., Patel D.J. Thermodynamic and structural factors in the removal of bulky DNA adducts by the nucleotide excision repair machinery // *Biopolymers.*– 2002.– V. 65, (3).– P. 202–210.
237. Maltseva E.A., Rechkunova N.I., Gillet L.C., Petruseva I.O., Schärer O.D., Lavrik O.I. Cross-linking of the NER damage recognition proteins XPC-HR23B, XPA and RPA to photoreactive probes that mimic DNA damages // *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.*– 2007.– V. 1770, (5).– P. 781–789.
238. Evdokimov A.N., Petruseva I.O., Pestryakov P.E., Lavrik O.I. Photoactivated DNA analogs of substrates of the nucleotide excision repair system and their interaction with proteins of NER-competent HeLa cell extract. // *Biochemistry.*– 2011.– V. 76, (1).– P. 188–200.
239. Lavrik O.I., Kolpashchikov D.M., Prasad R., Sobol R.W., Wilson S.H. Binary system for selective photoaffinity labeling of base excision repair DNA polymerases. // *Nucleic Acids Res.*– 2002.– V. 30, (14).– P. e73.
240. Lavrik O.I., Prasad R., Sobol R.W., Horton J.K., Ackerman E.J., Wilson S.H. Photoaffinity labeling of mouse fibroblast enzymes by a base excision repair intermediate: Evidence for the role of poly(ADP-ribose) polymerase-1 in DNA repair // *J. Biol. Chem.*– 2001.– V. 276, (27).– P. 25541–25548.
241. Khodyreva S.N., Lavrik O.I. Affinity modification in a proteomic study of DNA repair ensembles // *Russian Journal of Bioorganic Chemistry.*– 2011.– V. 37, (1).– P. 80–94.
242. Schuster G.B., Platz M.S. Photochemistry of Phenyl Azide // *Photochemistry of Phenyl Azide.*– 2007.– 69–143 p.

243. Knorre D.G., Godovikova T.S. Photoaffinity labeling as an approach to study supramolecular nucleoprotein complexes // *FEBS Letters.*– 1998.– V. 433, (1–2).– P. 9–14.
244. Petruseva I.O., Tikhanovich I.S., Chelobanov B.P., Lavrik O.I. RPA repair recognition of DNA containing pyrimidines bearing bulky adducts // *J. Mol. Recognit.*– 2008.– V. 21, (3).– P. 154–162.
245. Lavrik O., Kolpashchikov D., Weissart K., N H.-P. RPA subunit arrangement near the 3'-end of the primer is modulated by the length of the template strand and cooperative protein interactions // *Nucleic Acids Res.*– 1999.– V. 27, (21).– P. 4253–4240.
246. Persinger J., Bartholomew B. Mapping the contacts of yeast TFIIIB and RNA polymerase III at various distances from the major groove of DNA by DNA photoaffinity labeling // *J. Biol. Chem.*– 1996.– V. 271, (51).– P. 33039–33046.
247. Aboussekhra A., Biggerstaff M., Shivji M.K.K., Vilpo J.A., Moncollin V., Podust V.N., Protić M., Hübscher U., Egly J.M., Wood R.D. Mammalian DNA nucleotide excision repair reconstituted with purified protein components // *Cell.*– 1995.– V. 80, (6).– P. 859–868.
248. Evdokimov A.N., Petruseva I.O., Tsidulko A.J., Koroleva L.S., Serpokrylova I.J., Sil'nikov V.N., Lavrik O.I. Evaluation method of activity of nucleotide excision repair system in mammals.– *N.*, 2013. – № 2492242.
249. Huang J. Substrate spectrum of human excinuclease : Repair of abasic sites , methylated bases , mismatches , and bulky adducts // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*– 1994.– V. 91.– P. 12213–12217.
250. Sugawara K. The Xeroderma Pigmentosum Group C Protein Complex and Ultraviolet-Damaged DNA-Binding Protein: Functional Assays for Damage Recognition Factors Involved in Global Genome Repair // *Methods Enzymol.*– 2006.– V. 408, (6).– P. 171–188.
251. Petruseva I., Naumenko N., Kuper J., Anarbaev R., Kappenberger J., Kisker C., Lavrik O. The interaction efficiency of XPD-p44 with bulky DNA damages depends on the structure of the damage // *Front. Biosci.*– 2021. – V. 9. – 617160.
252. Smeaton M.B., Miller P.S., Ketner G., Hanakahi L.A. Small-scale extracts for the study of nucleotide excision repair and non-homologous end joining // *Nucleic Acids Res.*– 2007.– V. 35, (22).– P. 1–6.
253. Скоупс Р. Методы очистки белков // *Мир.* - М.– 1985.– P. 342.
254. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature.*– 1970.– V. 227, (5259).– P. 680–685.
255. Li L., Perdigaio J., Pegg A.E., Lao Y., Hecht S.S., Lindgren B.R., Reardon J.T., Sancar A., Wattenberg E. V., Peterson L.A. The influence of repair pathways on the cytotoxicity and mutagenicity induced by the pyridyloxobutylation pathway of tobacco-specific nitrosamines // *Chem. Res. Toxicol.*– 2009.– V. 22, (8).– P. 1464–1472.

256. Guo S., Leng J., Tan Y., Price N.E., Wang Y. Quantification of DNA Lesions Induced by 4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol in Mammalian Cells // *Chem. Res. Toxicol.*– 2019.– V. 32, (4).– P. 708–717.
257. Evdokimov A.N., Lavrik O.I., Petruseva I.O. Model DNA for investigation of mechanism of nucleotide excision repair // *Biopolym. Cell.*– 2014.– V. 30, (3).– P. 167–183.
258. Евдокимов А.Н., Петрусева И.О., Пестряков П.Е., Лаврик О.И. Фотоактивируемые ДНК-аналоги субстратов системы эксцизионной репарации нуклеотидов и их взаимодействие с белками NER-компетентного экстракта клеток HeLa. Синтез и применение протяженных модельных ДНК // *Биохимия.*– 2011.– Т. 76, (1).– С. 188–200.
259. Лукьянчикова Н.В. Взаимодействие белков NER-компетентных клеточных экстрактов с аналогами субстрата NER, содержащими фотоактивное повреждение: – Новосибирск, 2015.– 66 с.
260. Wilson D.M., Barsky D. The major human abasic endonuclease: Formation, consequences and repair of abasic lesions in DNA // *Mutat. Res. - DNA Repair.*– 2001.– V. 485, (4).– P. 283–307.
261. Pereira de Jesus K., Serre L., Zelwer C., Castaing B. Structural insights into abasic site for Fpg specific binding and catalysis: Comparative high-resolution crystallographic studies of Fpg bound to various models of abasic site analogues-containing DNA // *Nucleic Acids Res.*– 2005.– V. 33, (18).– P. 5936–5944.
262. Lebedeva N.A., Rechkunova N.I., Ishchenko A.A., Saparbaev M., Lavrik O.I. The mechanism of human tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1 in the cleavage of AP site and its synthetic analogs // *DNA Repair (Amst).*– 2013.– V. 12, (12).– P. 1037–1042.
263. Kutuzov M.M., Ilina E.S., Sukhanova M. V., Pyshnaya I.A., Pyshnyi D. V., Lavrik O.I., Khodyreva S.N. Interaction of poly(ADP-ribose) polymerase 1 with apurinic/apyrimidinic sites within clustered DNA damage // *Biochem.*– 2011.– V. 76, (1).– P. 147–156.
264. Wilson D., Takeshita M., Crollman A., Demple B. Incision Activity of Human Apurinic Endonuclease (Ape) at Abasic Site Analogs in DNA // *J. Biol. Chem.*– 1995.– V. 270, (27).– P. 16002–16007.
265. Naumenko N., Petruseva I., Lomzov A., Lavrik O. Recognition and removal of clustered DNA damages via NER // *DNA Repair.* – 2021. – V. 108. – 103225.
266. Gelfand C.A., Plum G.E., Grollman A.P., Johnson F., Breslauer K.J. Thermodynamic consequences of an abasic lesion in duplex DNA are strongly dependent on base sequence // *Biochemistry.*– 1998.– V. 37, (20).– P. 7321–7327.
267. Kuznetsova A.A., Matveeva A.G., Milov A.D., Vorobjev Y.N., Dzuba S.A., Fedorova O.S., Kuznetsov N.A. Substrate specificity of human apurinic/apyrimidinic endonuclease APE1 in the nucleotide incision repair pathway // *Nucleic Acids Res.*– 2018.– V. 46, (21).– P. 11454–11465.

268. Marathias V., Jerkovic B., Bolton P. Damage increases the flexibility of duplex DNA // *Nucleic Acids Res.*– 1999.– V. 27, (8).– P. 1854–1858.
269. Chen J., Dupradeau F.Y., Case D.A., Turner C.J., Stubbe J. DNA oligonucleotides with A, T, G or C opposite an abasic site: Structure and dynamics // *Nucleic Acids Res.*– 2008.– V. 36, (1).– P. 253–262.
270. Coppel Y., Berthet N., Coulombeau C., Coulombeau C., Garcia J., Lhomme J. Solution conformation of an abasic DNA undecamer duplex d(CGCACXCACGC)·d(GCGTGTGTGCG): The unpaired tryamine stacks inside the helix // *Biochemistry.*– 1997.– V. 36, (16).– P. 4817–4830.
271. Виноградова. Изогнутые дцДНК с заданными геометрическими характеристиками // *Биоорганическая Химия.*– 2009.– V. 35, (3).– P. 384–396.
272. Huang J.C., Svoboda D.L., Reardon J.T., Sancar A. Human nucleotide excision nuclease removes thymine dimers from DNA by incising the 22nd phosphodiester bond 5' and the 6th phosphodiester bond 3' to the photodimer // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*– 1992.– V. 89, (8).– P. 3664–3668.
273. Meneni S.R., D'Mello R., Norigian G., Baker G., Gao L., Chiarelli M.P., Cho B.P. Sequence effects of aminofluorene-modified DNA duplexes: Thermodynamic and circular dichroism properties // *Nucleic Acids Res.*– 2006.– V. 34, (2).– P. 755–763.
274. Lukyanchikova N. V, Petrusseva I.O., Evdokimov A.N., Silnikov V.N., Lavrik O.I. DNA with Damage in Both Strands as Affinity Probes and Nucleotide Excision Repair Substrates // *Biochem. (Mosc).*– 2016.– V. 81, (3).– P. 386–400.
275. Alemasova E.E., Naumenko K.N., Kurgina T.A., Anarbaev O., Lavrik O.I. The multifunctional protein YB-1 potentiates PARP1 activity and decreases the efficiency of PARP1 inhibitors // *Oncotarget.*– 2018.– V. 9, (34).– P. 23349–23365.
276. Hey T., Lipps G., Krauss G. Binding of XPA and RPA to damaged DNA investigated by fluorescence anisotropy // *Biochemistry.*– 2001.– V. 40, (9).– P. 2901–2910.
277. Teletchéa S., Komeda S., Teuben J.M., Elizondo-Riojas M.A., Reedijk J., Kozelka J. A pyrazolato-bridged dinuclear platinum(II) complex induces only minor distortions upon DNA-binding // *Chem. Eur. J.*– 2006.– V. 12, (14).– P. 3741–3753.
278. Lenglet G., David-Cordonnier M.H. DNA-destabilizing agents as an alternative approach for targeting DNA: Mechanisms of action and cellular consequences // *J. Nucleic Acids.*– 2010.– 290935.
279. Виноградова О.А. Влияние нуклеотидных вставок на субстратные и конформационные свойства ДНК-дуплексов: дис. ... канд. хим. наук: 02.00.10. – Новосибирск, 2011. – 160 с.
280. Lane D., Prentki P., Chandler M., Chandler A.M. Use of gel retardation to analyze protein-nucleic acid interactions // *Microbiol. Rev.*– 1992.– V. 56, (4).– P. 509–528.

281. Curuksu J., Zakrzewska K., Zacharias M. Magnitude and direction of DNA bending induced by screw-axis orientation: Influence of sequence, mismatches and abasic sites // *Nucleic Acids Res.*– 2008.– V. 36, (7).– P. 2268–2283.
282. Rettig M., Germann M.W., Wang S., Wilson W.D. Molecular Basis for Sequence-Dependent Induced DNA Bending // *ChemBioChem.*– 2013.– V. 14, (3).– P. 323–331.
283. Rumora A.E., Kolodziejczak K.M., Wagner A.M., Núñez M.E. Thymine Dimer-Induced Structural Changes to the DNA Duplex Examined with Reactive Probes // *Biochemistry.*– 2008.– V. 47, (49).– P. 13026.
284. Poklar N., Pilch D.S., Lippard S.J., Redding E.A., Dunham S.U., Breslauer K.J. Influence of cisplatin intrastrand crosslinking on the conformation, thermal stability, and energetics of a 20-mer DNA duplex // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*– 1996.– V. 93, (15).– P. 7606–7611.
285. Skosareva L. V., Lebedeva N.A., Rechkunova N.I., Kolbanovskiy A., Geacintov N.E., Lavrik O.I. Human DNA polymerase  $\lambda$  catalyzes lesion bypass across benzo[a]pyrene-derived DNA adduct during base excision repair // *DNA Repair (Amst).*– 2012.– V. 11, (4).– P. 367–373.
286. Skosareva L. V., Lebedeva N.A., Lavrik O.I., Rechkunova N.I. Repair of Bulky DNA Lesions Deriving from Polycyclic Aromatic Hydrocarbons // *Mol. Biol.*– 2013.– V. 47, (5).– P. 634–644.
287. McKenzie J.A., Strauss P.R. Oligonucleotides with bistranded abasic sites interfere with substrate binding and catalysis by human apurinic/apyrimidinic endonuclease // *Biochemistry.*– 2001.– V. 40, (44).– P. 13254–13261.
288. Gattuso H., Durand E., Bignon E., Morell C., Georgakilas A.G., Dumont E., Chipot C., Dehez F., Monari A. Repair Rate of Clustered Abasic DNA Lesions by Human Endonuclease: Molecular Bases of Sequence Specificity // *J. Phys. Chem. Lett.*– 2016.– V. 7, (19).– P. 3760–3765.
289. Lukyanchikova N.V., Petrusheva I.O., Evdokimov A.N., Koroleva L.S., Lavrik O.I. DNA Bearing Bulky Fluorescent and Photoreactive Damage in Both Strands as Substrates of the Nucleotide Excision Repair System // *Mol. Biol.*– 2018.– V. 52, (2).– P. 237–246.
290. Mu H., Zhang Y., Geacintov N.E., Broyde S. Lesion Sensing during Initial Binding by Yeast XPC/Rad4: Toward Predicting Resistance to Nucleotide Excision Repair // *Chem. Res. Toxicol.*– 2018.– V. 31, (11).– P. 1260–1268.
291. Vinogradova O.A., Eremeeva E. V., Lomzov A.A., Pyshnaya I.A., Pyshnyi D. V. Bent dsDNA with defined geometric characteristics in terms of complexes of bridged oligonucleotides // *Russ. J. Bioorganic Chem.*– 2009.– V. 35, (3).– P. 349–359.
292. Евдокимов А.Н. Создание аналогов субстратов системы эксцизионной репарации нуклеотидов и анализ их взаимодействия с белками клеточных экстрактов: дис. ... канд. биол. наук: 03.01.04. – Новосибирск, 2015.– 128 с.

293. Coin F., Marinoni J.C., Rodolfo C., Fribourg S., Pedrini A.M., Egly J.M. Mutations in the XPD helicase gene result in XP and TTD phenotypes, preventing interaction between XPD and the p44 subunit of TFIIH // *Nat. Genet.*– 1998.– V. 20, (2).– P. 184–188.
294. Barnett J., Kuper J., Koelmel W., Kisker C., Kad N., Version D. The TFIIH subunits p44/p62 act as a damage sensor during nucleotide excision repair // *Nucleic Acids Res.*– 2020.– V. 48, (22).– P. 12689–12696.
295. Dubaele S., De Santis L.P., Bienstock R.J., Keriél A., Stefanini M., Van Houten B., Egly J.M. Basal transcription defect discriminates between xeroderma pigmentosum and trichothiodystrophy in XPD patients // *Mol. Cell.*– 2003.– V. 11, (6).– P. 1635–1646.
296. Petruseva I.O., Evdokimov A.N., Lavrik O.I. Molecular mechanism of global genome nucleotide excision repair // *Acta Naturae.*– 2014.– V. 6, (20).– P. 23–34.
297. Buechner C.N., Heil K., Michels G., Carell T., Kisker C., Tessmer I. Strand-specific recognition of DNA damages by XPD provides insights into Nucleotide excision repair substrate versatility // *J. Biol. Chem.*– 2014.– V. 289, (6).– P. 3613–3624.

Приложение 1. Все ОДН, использованные в работе.

Список ОДН	Последовательность
ОДН-1	5'-tggacgatatcccgaagaggcccggcagtagccggcataacc
ОДН-2	5'-P-tgttagatttcatacacggtgcctgactgcgttagcaatt
ОДН-3	5'-ggcataggcttggtatgccggtac
ОДН-4	5'-gtatgaaatctaacaatgcgctcat
ОДН-5	5'-tggacgatatcccgaagaggcccggcagtagccggcataaccaagcctatgcctacagcatccaggg
ОДН-6	5'-gacggtgccgaggatgacgatgagcgcattgttagatttcatacacggtgcctgactgcgttagcaatt
ОДН-7	5'-catcctcggcaccgtcacctggatgctgtaggcatag
ОДН-8	FAM-5'-aagcctatgcctacagc
ОДН-9	5'-P-ccgaggatgacgatgagcgcga
ОДН-10	5'-gtcatcctcggcaccgtcgcctggatgctgt
ОДН-11	5'-aagcctatgcctacagc
ОДН-12	5'-aagcctatgcctacagcatccaggg
ОДН-13	5'-P-gacggtgccgaggatgacgatgagcgcga
ОДН-14	5'-aattgctaaccagtcaggcaccgtgtatgaaatctaaca
ОДН-15	5'-P-ggttatgccggtactgccggcctcttgcgggatatcgtcca
ОДН-16	5'-cgatgagcgcattgttagatttc
ОДН-17	5'-agtaccggcataaccaagcctatgcc
ОДН-18	5'-gggggctcggcaccgtcgcctggatgctgtagg-P
ОДН-19	5'-ggggtcaggcaccgtgtatgaaatctaacaat-P
ОДН-20	5'-tgcgctcatcgtcatcctcggcaccgtcgcctggatg-3'
ОДН-21	5'-tgcgctcatcgtcatcctcggcaccgtc <b>D</b> ccctggatg-3'
ОДН-22	5'-tgcgctcatcgtcatcctcggc <b>D</b> ccgtcgcctggatg-3'
ОДН-23	5'-tgcgctcatcgtcatcctcggcaccgtcgc <b>D</b> tggatg-3'
um (54, цепь 1)	5'-aagcctatgcctacagcatccagggcgacggtgccgaggatgacgatgagcgcga-3'
nFlu (54)	5'-aagcctatgcctacagcatccaggg <b>F</b> gacggtgccgaggatgacgatgagcgcga
um (54, цепь 2)	5'-tgcgctcatcgtcatcctcggcaccgtcgcctggatgctgtaggcataggctt
DEG <sub>20</sub> (54)	5'-tgcgctcatcgtcatcctcggcaccgtcgcctggatgctgtaggcat <b>D</b> ggctt
DEG <sub>10</sub> (54)	5'-tgcgctcatcgtcatcctcggcaccgtcgcctggatg <b>D</b> ttaggcataggctt
DEG <sub>6</sub> (54)	5'-tgcgctcatcgtcatcctcggcaccgtcgcctg <b>D</b> atgctgtaggcataggctt
DEG <sub>3</sub> (54)	5'-tgcgctcatcgtcatcctcggcaccgtcgc <b>D</b> tggatgctgtaggcataggctt
DEG <sub>0</sub> (54)	5'-tgcgctcatcgtcatcctcggcac <b>D</b> gtcgcctggatgctgtaggcataggctt
DEG <sub>+4</sub> (54)	5'-tgcgctcatcgtcatcctcggc <b>D</b> ccgtcgcctggatgctgtaggcataggctt
DEG <sub>+6</sub> (54)	5'-tgcgctcatcgtcatcctc <b>D</b> caccgtcgcctggatgctgtaggcataggctt
DEG <sub>+8</sub> (54)	5'-tgcgctcatcgtcatcct <b>D</b> ggcaccgtcgcctggatgctgtaggcataggctt

DEG (54)	5'-aagcctatgcctacagcatccaggg <b>D</b> gacggtgccgaggatgacgatgagcgca
nFlu <sub>-20</sub> (54)	5'-tgcgctcatcgtcatcctcggcaccgtcgcctggatgctgtaggcat <b>F</b> ggctt
nFlu <sub>-10</sub> (54)	5'-tgcgctcatcgtcatcctcggcaccgtcgcctggatg <b>F</b> ttaggcataggctt
nFlu <sub>-6</sub> (54)	5'-tgcgctcatcgtcatcctcggcaccgtcgcctg <b>F</b> atgctgtaggcataggctt
nFlu <sub>-3</sub> (54)	5'-tgcgctcatcgtcatcctcggcaccgtcgc <b>F</b> tggatgctgtaggcataggctt
nFlu <sub>0</sub> (54)	5'-tgcgctcatcgtcatcctcggcac <b>F</b> gtcgcctggatgctgtaggcataggctt
nFlu <sub>+4</sub> (54)	5'-tgcgctcatcgtcatcctcggc <b>F</b> ccgtcgcctggatgctgtaggcataggctt
nFlu <sub>+6</sub> (54)	5'-tgcgctcatcgtcatcctcg <b>F</b> caccgtcgcctggatgctgtaggcataggctt
nFlu <sub>+8</sub> (54)	5'-tgcgctcatcgtcatcct <b>F</b> ggcaccgtcgcctggatgctgtaggcataggctt
um (16, цепь 1)	5'-atccagggcgacggtg
nAnt (16)	5'-atccaggg <b>A</b> gacggtg
Fab(5)-dC (16)	5'-atccaggg <b>C</b> gacggtg
nFlu (16)	5'-atccaggg <b>F</b> gacggtg
DEG (16)	5'-atccaggg <b>D</b> gacggtg
um (16, цепь 2)	5'-caccgtcgcctggat
DEG <sub>-3</sub> (16)	5'-caccgtcgc <b>F</b> tggat
DEG <sub>0</sub> (16)	5'-caccgtc <b>F</b> ccctggat
DEG <sub>+4</sub> (16)	5'-cac <b>F</b> gtcacctggat

**Обозначения в таблице:** **F** – вставка nFlu, **A** – вставка nAnt, **D** – вставка DEG, «p» в структуре ОДН означает 5'- или 3'-концевой фосфат