

УДК 577.1

Молекулярные механизмы действия системы общегеномной эксцизионной репарации нуклеотидов

И. О. Петрусева¹, А. Н. Евдокимов^{1,2}, О. И. Лаврик^{1,2,3*}¹Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, 630090, Новосибирск, просп. Акад. Лаврентьева, 8²Алтайский государственный университет Министерства образования и науки РФ, 656049, Барнаул, просп. Ленина, 61³Новосибирский национальный исследовательский государственный университет Министерства образования и науки РФ, 630090, Новосибирск, ул. Пирогова, 2

*E-mail: lavrik@niboch.nsc.ru

Поступила в редакцию 31.10.2013

РЕФЕРАТ Эксцизионная репарация нуклеотидов (NER) в клетках высших эукариот – многостадийный процесс, с помощью которого распознаются и удаляются из ДНК повреждения, вызывающие заметные нарушения ее регулярной структуры, такие, как УФ-повреждения и объемные химические аддукты. В клетках высших эукариот NER – универсальный путь удаления объемных повреждений. Нарушения в работе системы NER ассоциированы с появлением симптомов таких заболеваний, как пигментная ксеродерма, синдром Коккейна и трихотиодистрофия, которые характеризуются повышенной чувствительностью к УФ-облучению и высокой предрасположенностью к онкологическим заболеваниям (в случае пигментной ксеродермы), а также множественными системными неврологическими и иммунологическими аномалиями. Система NER эукариот удаляет из поврежденной цепи ДНК 24–32-звенные фрагменты с последующим восстановлением интактной двойной спирали с помощью репаративного синтеза и лигирования. В процесс NER вовлечено примерно 30 полипептидов. Существуют две ветви NER – репарация, сопряженная с транскрипцией (TCR), и общегеномная репарация (GGR), различающиеся типом белка-сенсора, который осуществляет первичное узнавание повреждения. В данном кратком обзоре рассмотрены современные представления о молекулярных механизмах, лежащих в основе процессов узнавания повреждений и их удаления из ДНК млекопитающих.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА молекулярные механизмы узнавания и удаления повреждений; факторы репарации; эксцизионная репарация нуклеотидов.

ВВЕДЕНИЕ

Эксцизионная репарация нуклеотидов (nucleotide excision repair, NER) – один из основных путей защиты клетки от различных структурно и химически различающихся повреждений ДНК. Эти повреждения представляют собой, как правило, объемные ковалентные аддукты, сформированные азотистыми основаниями в результате воздействия УФ-света, ионизирующих излучений, электрофильных химических мутагенов, некоторых лекарственных препаратов, а также химически активных эндогенных метаболитов, включая реакционноспособные производные кислорода и азота [1]. В клетках высших эукариот система NER с высокой точностью удаляет из ДНК 24–32-звенные фрагменты, содержащие поврежденное звено. Последующий репаративный синтез с использованием неповрежденной цепи в ка-

честве матрицы и лигирование возникшего одноцепочечного разрыва завершают процесс репарации ДНК. Идентифицированы основные гены, инактивированные в дефектных по NER клетках, определены кодируемые ими белковые факторы и ферменты. Известно, что процесс осуществляется за счет координированной работы примерно 30 белков, последовательно формирующих на ДНК комплексы переменного состава [1–3]. Выделяют два варианта NER, различающихся на уровне начального узнавания повреждения. GG-NER (global genome nucleotide excision repair) осуществляет поиск и удаление объемных повреждений во всем геноме, включая нетранскрибируемые участки и молчащий хроматин. TC-NER – репарация, сопряженная с транскрипцией (transcription-coupled nucleotide excision repair), происходит, когда повреждение транскри-

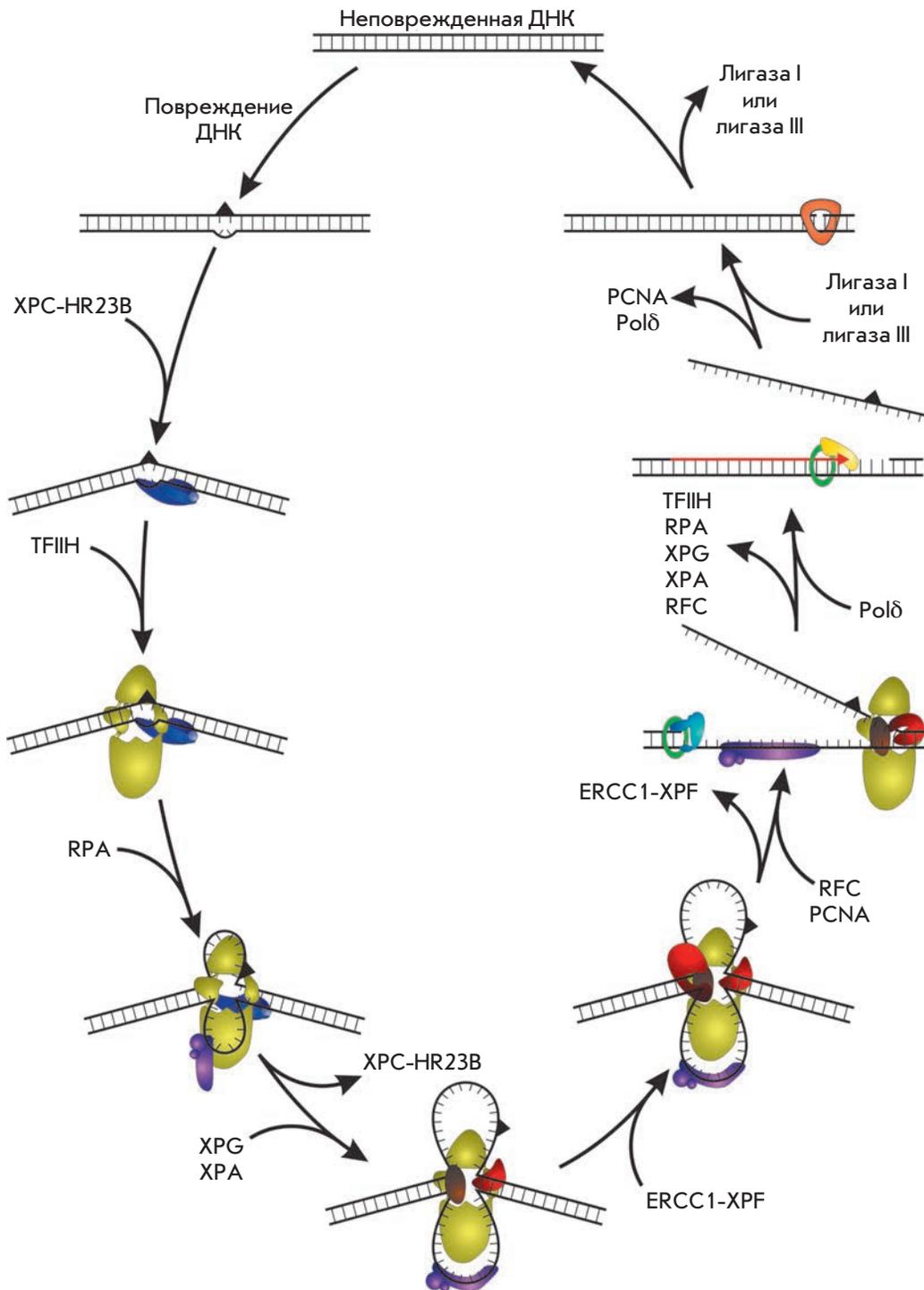


Рис. 1. Схема процесса общегеномной эксцизионной репарации нуклеотидов

бируемой цепи ДНК ограничивает транскрипционную активность. TC-NER инициируется остановкой РНК-полимеразы II при встрече с повреждением, расположенным в транскрибируемой цепи, в то время как за обнаружение повреждений в процессе GG-NER отвечает специализированный белковый фактор XPC. На рис. 1 представлена схема процесса

GG-NER. Данные об основных белках – участниках процесса NER, представленные в таблице.

Нарушения в работе системы NER приводят к возникновению нескольких патологических состояний – пигментной ксеродермы (Xeroderma Pigmentosum, XP), синдрома Коккейна (CS) и трихотриодистрофии (TTD), для которых характерны

Белки, участвующие в процессе NER, и их функции

Фактор	Субъединица	Ген	Масса, кДа / (размер, а.о.)	Функция, выполняемая в процессе NER	Взаимодействие с другими факторами
ХРС	HR23В	<i>hhr23b</i>	43 / (409)	Узнавание искаженной структуры ДНК	TFIIH ХРА DDB
	ХРС	<i>xpc</i>	125 / (940)		
	CEN2	<i>cen2</i>	20 / (172)		
DDB	DDB1	<i>ddb1</i>	127 / (1140)	Узнавание повреждения, взаимодействие с хроматином	ХРС RPA
	DDB2	<i>ddb2</i>	48 / (428)		
ХРА	ХРА	<i>xpa</i>	31 / (273)	Структурная функция, связывание с поврежденной цепью	ХРА RPA TFIIH ERCC1
RPA	RPA70	<i>rpa1</i>	68 / (616)	Связывание одноцепочечной ДНК	ХРА XPG PCNA/RFC
	RPA32	<i>rpa2</i>	30 / (270)		
	RPA14	<i>rpa3</i>	14 / (121)		
TFIIH	ХРВ	<i>xpb</i>	89 / (782)	АТР-аза, минорная хеликазная активность 3'→5'-ДНК-хеликаза	ХРА ХРС XPF XPG
	XPD	<i>xpd</i>	87 / (760)	АТР-зависимая 5'→3'-ДНК-хеликаза; проверка наличия модификации	
	p62	<i>gtf2h1</i>	62 / (548)	Коровая субъединица, стимулирует ХРВ	
	p44	<i>gtf2h2</i>	44 / (395)	Коровая субъединица, стимулирует XPD	
	p34	<i>gtf2h3</i>	34 / (308)	Связывание ДНК	
	p52	<i>gtf2h4</i>	52 / (462)	Регуляторная субъединица для АТР-азной активности ХРВ, функционирующей в комплексе TFIIH	
	p8	<i>gtf2h5 (ttda)</i>	8 / (71)	Взаимодействие с p52, стимуляция АТР-азной активности ХРВ	
	Mat1	<i>mnat1</i>	36 / (309)	Входит в состав САК-комплекса	
	Cdk7	<i>cdk7</i>	39 / (346)	Фосфорилирует РНК-полимеразу II и другие субстраты	
Циклин Н	<i>ccnh</i>	38 / (323)	Регуляция клеточного цикла		
XPF	ERCC1	<i>ercc1</i>	33 / (297)	Эндонуклеаза, катализирует образование одноцепочечного разрыва в ДНК с 5'-стороны от повреждения	ХРА TFIIH
	XPF	<i>xpf</i>	103 / (905)		
XPG	XPG	<i>xpg</i>	133 / (1186)	Эндонуклеаза, катализирует образование одноцепочечного разрыва в ДНК с 3'-стороны от повреждения	TFIIH RPA PCNA
RFC	RFC1	<i>rfc1</i>	128 / (1148)	АТР-зависимое присоединение PCNA	PCNA RPA
	RFC2	<i>rfc2</i>	39 / (354)		
	RFC3	<i>rfc3</i>	41 / (356)		
	RFC4	<i>rfc4</i>	40 / (363)		
	RFC5	<i>rfc5</i>	38 / (340)		
PCNA	PCNA	<i>pcna</i>	3x37 / (3x261)	Фактор, обеспечивающий процессивность ДНК-полимераз	RFC XPG Polδ
Polδ	p125	<i>p125</i>	124 / (1107)	ДНК-полимераза	PCNA
	p66	<i>p66</i>	51 / (466)		
	p50	<i>p50</i>	51 / (469)		
	p12	<i>p12</i>	12 / (107)		
Polε	p261	<i>p261</i>	261 / (2286)	ДНК-полимераза	PCNA
	p59	<i>p59</i>	60 / (527)		
	p17	<i>p17</i>	17 / (147)		
	p12	<i>p12</i>	12 / (117)		
Лигаза I	Ligase I	<i>ligI</i>	102 / (919)	Лигирование одноцепочечного разрыва	
Лигаза III	Ligase III	<i>ligIII</i>	103 / (862)		

УФ-чувствительность и высокий риск развития онкологических заболеваний, а также к ряду нейродегенеративных проявлений [4–6].

С латинским названием пигментной ксеродермы (*Xeroderma Pigmentosum*) связаны обозначения ряда генов, мутации и нарушение работы которых приводят к появлению симптомов заболевания, а также названия кодируемых этими генами белков (факторы ХРА–ХРЕ). ХР – синдром, характеризующийся фоточувствительностью, атрофией кожи, ее гиперпигментацией и высокой частотой возникновения индуцированного солнечным светом рака кожи. У больных ХР повышен (по крайней мере, в 1000 раз) риск развития опухолей внутренних органов [6, 7]. Кроме того, заболевание часто ассоциировано с неврологическими нарушениями. Различные симптомы, наблюдаемые при ХР, характерны для пожилых людей, и отражают преждевременное старение, обусловленное накоплением нерепарированных объемных повреждений ДНК, в том числе некоторых окислительных [8–10].

УЗНАВАНИЕ ПОВРЕЖДЕНИЯ

Распознавание повреждения – ключевая стадия в инициации NER, определяющая скорость репарации [1, 2, 11]. К общим признакам, необходимым для первичного узнавания повреждения системами репарации, относятся искажение регулярной структуры двухцепочечной ДНК (дцДНК) и изменение ее стабильности. Наиболее часто системой эксцизионной репарации нуклеотидов и оснований (base excision repair, BER) удаляются химические модификации азотистых оснований. Для NER наиболее характерно удаление из состава ДНК возникающих в результате УФ-облучения продуктов фотосшивок соседних пиримидиновых оснований, платиновых аддуктов, сшивок белок–ДНК, модификаций, вызванных взаимодействием с ДНК активных производных бенз[а]пирена, бензо[с]антрацена, ацетиламинофлуорена, а также других объемных аддуктов, в большей степени нарушающих регулярную двухцепочечную структуру ДНК, чем повреждения, репарируемые системой BER [12]. Тем не менее большинство субстратов эксцизионных систем репарации не вносят столь драматических структурных и термодинамических изменений в дцДНК, как двухцепочечные разрывы и межцепочечные сшивки. Поэтому выявление таких повреждений представляет специальную задачу для клетки, решение которой требует функционирования высокочувствительного механизма их распознавания. В отличие от BER, где узнавание и одновременно удаление поврежденного основания производит специализированная гликозилаза, в случае NER узнавание повреждения и его

удаление осуществляют разные белки. Функции первичного узнавания всего спектра объемных повреждений в эукариотической системе NER выполняют универсальные белки-сенсоры. В случае TC-NER это остановленная у повреждения транскрибирующая РНК-полимераза II; в GG-NER – комплексы фактора ХРС и гетеродимер DDB1-DDB2 (фактор ХРЕ), ускоряющий репарацию УФ-повреждений [1, 2]. В целом распознавание повреждения в NER – сложный организованный процесс, в котором выделяют несколько этапов, осуществляемых целым набором белков, образующих в районе повреждения комплексы переменного состава. Процесс завершается формированием комплекса, готового к удалению поврежденного участка ДНК с помощью специализированных эндонуклеаз NER [1, 2].

Главный фактор, обеспечивающий стабильность регулярной спиральной структуры двухцепочечной ДНК, – комплементарные взаимодействия оснований. Объемное повреждение приводит к нарушению спаривания оснований и появлению в молекуле дцДНК флуктуирующего «одноцепочечного» участка (в англоязычной литературе определяется как «single stranded character»). Неповрежденная ДНК также не является статичной молекулой. Цепи ДНК находятся в постоянном тепловом движении, что обеспечивает небольшие быстрые изменения расстояния между комплементарными основаниями. Однако эти пико- и наносекундные колебания, существующие в отсутствие повреждения, вероятно, слишком кратковременны для того, чтобы их могли распознать факторы репарации. Методом молекулярного моделирования показано, что введение в ДНК объемного повреждения может приводить к появлению более существенных и долгоживущих «раскрытий» двойной спирали [13, 14]. Например, в районе циклобутанпиримидинового димера такие флуктуации в структуре ДНК возникают в 25 раз более часто, нежели в неповрежденном дуплексе. Кроме того, радикально возрастает амплитуда колебаний, так как нарушается взаимодействие между комплементарными цепями ДНК. Динамические изменения, возникшие в результате повреждения основания, вызывают, главным образом, колебания участка неповрежденной цепи, комплементарного участку, содержащему повреждение, в то время как поврежденный фрагмент ДНК менее подвижен [15, 16]. Такие колебания могут служить сигналом для привлечения факторов репарации, осуществляющих начальный этап узнавания повреждения. О важной роли, которую в процессе узнавания играет интактная цепь ДНК, свидетельствовали также результаты ряда экспериментов, в частности, анализа эффективности специфической эксцизии с использованием модельных ДНК различ-

ной структуры, позволившие сформулировать концепцию о двухэтапном или состоящем из двух частей («bipartite») процессе узнавания в NER [15, 16]. Было показано, что белки системы NER, присутствующие в клеточном экстракте, могут инициировать репарацию в том случае, когда модельная ДНК содержит химическую модификацию и нарушение вторичной структуры. Так, например, эксцизия участка, содержащего объемный, но не нарушающий регулярную структуру ДНК-дуплекса С4'-пивалоильный аддукт дезоксирибозы, происходила только в том случае, когда он располагался в месте искусственно созданного короткого участка нарушения спаривания. Участки неспаренных оснований, не содержащие модификации, не являются субстратами специфической эксцизии, как не являются субстратами и структуры, содержащие химическую модификацию, введенную напротив петли, образованной немодифицированной цепью [16].

Поиску белков, ответственных за первичное узнавание повреждения и дальнейшее привлечение последующих факторов NER, посвящено большое число исследований. Хотя доказательства ключевой роли XPC в инициации NER появились достаточно [17–19], результаты оценки сродства к поврежденной ДНК и анализа специфичности связывания с поврежденным субстратом позволяли отводить роль сенсора фактору XPA и его комплексам с RPA и XPC [20–23]. С применением конфокальной микроскопии и несущих флуоресцентную метку белков показали, что XPC иммобилизуется в местах УФ-повреждений и в отсутствие XPA (XPA-дефектные клетки), тогда как в XPC-дефектных клетках XPA не связывается с поврежденными участками ДНК [3, 18]. Согласно биохимическим исследованиям, присутствие XPC необходимо для вовлечения остальных факторов в процесс GG-NER [17, 19, 24]. Для выяснения механизма первичного узнавания повреждения, которое XPC осуществляет на фоне огромного количества интактной ДНК, были применены различные подходы, в том числе методы визуализации, позволяющие следить за перемещением флуоресцентных белков в контексте хроматина в живой клетке. С использованием подхода FRAP/FLIP (fluorescence recovery after photobleaching/fluorescence loss in photobleaching) было показано, что динамика перемещений и способ внутриядерной локализации GFP-XPC отличаются от динамики и локализации других факторов NER (GFP-XPA, TFIIH-GFP). XPC постоянно сканирует геномную ДНК в поисках повреждений. Сканирование происходит в режиме ассоциации-диссоциации с формированием множества короткоживущих комплексов. При встрече с поврежденными участками образуются более стабильные комплексы XPC

с ДНК, после чего к поврежденному участку привлекаются другие факторы NER. Кроме того, XPC постоянно экспортируется из ядра и импортируется обратно. Такой обмен XPC в отсутствие повреждений поддерживает стационарный уровень его концентрации в ядре, предотвращая избыточное зондирование ДНК, способное препятствовать протеканию других процессов нуклеинового обмена. При любых воздействиях на клетку, приводящих к повреждению ДНК, скорость транспорта XPC в цитоплазму снижается, XPC накапливается в ядре, что способствует быстрому ответу системы репарации на генотоксическое воздействие. Наиболее выражен этот эффект при появлении повреждений, репарируемых NER. При этом обмен XPC между ядром и цитоплазмой затрудняется на 6–8 ч, что заметно превышает время нахождения XPC в составе комплексов NER. В качестве причины такой длительной остановки обмена обсуждается, в частности, медленная репарация некоторых типов УФ-повреждений [25]. Известно, что для эффективного узнавания УФ-повреждений XPC необходимо участие белка-партнера – гетеродимера UV-DDB [26–29].

Молекулярные основы взаимодействия XPC с ДНК интенсивно изучаются. От знания деталей механизма первичного узнавания ДНК-субстрата сенсорным белком зависит понимание взаимосвязи между структурой повреждения и скоростью его удаления из ДНК, а также того, каким образом фактор XPC находит поврежденные нуклеотиды на фоне огромного избытка неповрежденной ДНК. Значительному прогрессу в изучении устройства комплекса белка-сенсора с поврежденной ДНК способствовали рентгеноструктурные исследования комплекса Rad4 – дрожжевого ортолога XPC. Анализ структуры кристаллов комплекса укороченной формы Rad4 (а.о. 123–632) с белком Rad23 и гетеродуплексом, содержащим циклобутан-пиримидиновый димер, показал, что большой (трансглутаминазный, TGD) домен Rad4 вместе с одной β-шпилькой (VHD1) образуют C-образную структуру, контактируя с 11 нуклеотидами неповрежденной дцДНК с 3'-стороны от повреждения. Другая часть Rad4 состоит из шпильчатых доменов VHD2 и VHD3, формирующих, в основном, Ван-дер-Ваальсовы контакты с ДНК-субстратом вблизи повреждения. Длинная β-шпилька, выступающая из VHD3, внедрена в двойную спираль, вызывая перегиб остова ДНК. Происходит вытеснение из спирали не только сшитых пиримидинов, но и расположенных напротив оснований неповрежденной цепи. При этом белок не контактирует с повреждением, взаимодействуя лишь с двумя соседними основаниями и двумя расположенными напротив CPD. Каждое из неповрежденных оснований оказывается зажатым

между остатками ароматических аминокислот из мотива VHD2/VHD3 [30]. Такой способ взаимодействия с оцДНК типичен для ОВ-субдомена – структурного элемента, представленного в белках с повышенным сродством к одноцепочечной ДНК [31]. Полученная для Rad4 картина хорошо соответствует представлениям о способе взаимодействия белка XPC с поврежденной ДНК, основанным на данных о его структуре, и результатах биохимических исследований. С применением метода атомной силовой микроскопии было показано, что связывание XPC приводит к возникновению перегиба остова ДНК-дуплекса в районе повреждения с образованием угла $\sim 140\text{--}130^\circ$ [32]. Возникающий перегиб оси спирали поврежденной ДНК, как показано с помощью перманганатного футпринтинга, сопровождается частичным плавлением дуплекса (примерно на 4–7 нуклеотидов) [33]. Сходство способов расположения факторов RAD4 и XPC на поврежденной ДНК подтверждается результатами экспериментов по фотопришивке этих белков к ДНК, содержащей объемную модификацию [34]. Очевидно, что именно такой способ взаимодействия XPC с ДНК, «стратегия не прямой проверки» наличия структурных нарушений, приводящих к повышенному уровню колебаний неповрежденной цепи, является основой невероятно широкой субстратной специфичности системы GG-NER. В структуре XPC человека обнаружен также трансглутаминазный домен и домен, близкий по структуре ОВ-субдомену фактора RPA, взаимодействующий с оцДНК с использованием «ароматического сенсора повреждений» – пары аминокислотных остатков Trp690 и Phe733 [35–37].

Эксперименты с применением FRAP, в которых были использованы укороченные с N- и C-концов формы XPC, позволили выявить основной фрагмент XPC, отвечающий за узнавание поврежденной ДНК. Оказалось, что фрагмент, составляющий фактически только 15% от полноразмерного XPC (минимальный сенсор), способен распознавать УФ-повреждения в живых клетках. Минимальный сенсорный фрагмент проявляет предпочтение к гетеродуплексам и одноцепочечным олигонуклеотидам, распознает повреждения, используя сродство к участкам, водородные связи которых нарушены. Фрагмент состоит из VHD1, VHD2 и короткого мотива (25 аминокислотных остатков), расположенного между доменами VHD2 и VHD3 и уложенного в структуру, названную β -витком (β -turn – поворот, виток). Эффективность работы минимального сенсора повреждений зависит от специфических свойств β -витка [38, 39]. Этот короткий фрагмент полипептида способен как притягиваться к ДНК, так и отталкиваться от нее, что дает XPC возможность динамически взаимодействовать с ДНК в контексте генома и облегчает узнавание по-

вреждения, обеспечивая достаточную мобильность молекул белка-сенсора, сканирующих ДНК. Укороченный с C-конца XPC, содержащий β -виток, сохраняет некоторую остаточную активность в репарации, что установлено с помощью метода реактивации клеток. Повышенную подвижность XPC в ядрах живых клеток подтверждают результаты оценки динамики перемещений белка с использованием фотоотбеливания [24]. С использованием того же подхода было показано, что только в ядрах клеток, содержащих мутантные формы XPC с сохраненным β -витком, наблюдалась быстрая иммобилизация XPC после УФ-облучения. Стоит особо отметить, что полипептидный фрагмент, включающий VHD1 и VHD2, также действует как минимальный сенсор только при наличии β -витка. Биохимические эксперименты показывают, что подвижность XPC в ядре, определяемая этим элементом структуры, обусловлена отталкиванием молекулы белка от неповрежденной дцДНК. И наконец, в контексте полноразмерного XPC динамическая роль β -витка подтверждена результатами сайт-направленного мутагенеза с заменой глутаминовой кислоты на лизин. Эта инверсия заряда была проведена в предположении, что она может уменьшать силы электростатического отталкивания между отрицательно заряженной боковой цепью белка и фосфатами в остове ДНК. Как и предполагалось, инверсия заряда увеличивала сродство мутантных молекул XPC к неповрежденной ДНК, приводя к уменьшению их мобильности в ядре и снижая активность системы GG-NER. Таким образом, β -виток играет ключевую роль в регуляции динамики взаимодействия XPC с нормальным ДНК-дуплексом. Благодаря своей способности отталкиваться от ДНК, этот субдомен облегчает узнавание повреждения, придавая достаточную мобильность молекулам XPC, находящимся в поисках повреждений в геноме [24, 35–38]. Нуклеопротеиновые интермедиаты, образующиеся при начальном скрининге, могут превращаться в прочный узнающий комплекс при связывании XPC с аномально осциллирующим участком нативной цепи способом, при котором исключены прямые контакты XPC с повреждением [29, 36–39].

В клетке XPC существует в виде гетеротримерного комплекса XPC-HR23B-Cen2 [1, 2, 18]. Субъединица HR23B обеспечивает стабильность, защиту от протеасомной деградации и стимуляцию ДНК-связывающей активности XPC. Рекомбинантный гетеродимер XPC-HR23B представляет собой прочный комплекс, который взаимодействует с различными типами повреждений *in vitro* и широко используется для проведения реакции NER в реконструированной системе [18, 40, 41]. Взаимодействие XPC-HR23B с поврежденной ДНК было проанализировано с при-

менением метода аффинной модификации. В качестве зондов использовали ДНК-дуплексы различной структуры, содержащие объемные модификации, в том числе фотоактивные фторхлоразидопиридинильные повреждения. Ряд модельных дуплексов содержал аналоги неповрежденных цепей, созданные с использованием нуклеотидных звеньев с 4-тио- и 5-йод-модифицированными основаниями – фотореагентами с нулевой длиной линкера [34, 42–44]. Использованы также дуплексы, содержащие платиновый аддукт [45]. Мишенью модификации во всех случаях была только большая субъединица ХРС. Второй высокомолекулярный нуклеопротеиновый аддукт с меньшей электрофоретической подвижностью возникал в результате фотопришивки по различным аминокислотным остаткам ДНК-связывающей субъединицы ХРС [44]. Кроме того, продукт белок-белковых шпиков ХРС и HR23В, который появляется после жесткого (254 нМ) и длительного (60 мин) УФ-облучения и выявляется с помощью вестерн-блоттинга, не только не несет радиоактивной метки, но и образуется независимо от присутствия ДНК-зонда [45]. Отсутствие продуктов фотопришивки HR23В к аналогам поврежденной ДНК указывало на то, что эта субъединица комплекса не участвует в непосредственных контактах с ДНК. Совсем недавно с использованием конфокальной микроскопии было показано, что в клетке HR23В, в отличие от ХРС, не иммобилизуется на поврежденной ДНК, после связывания ХРС он высвобождается из комплекса [46].

Функции центрина-2 в ХРС-комплексе до конца не выяснены. Известно, однако, что присутствие этого белка повышает стабильность, может контролировать сродство/селективность связывания ДНК димером ХРС-HR23В и вовлечение в процесс репарации фактора ТFIIN за счет взаимодействия с С-концевым фрагментом ХРС [35].

С нуклеопротеиновым комплексом, сформированным поврежденной ДНК и ХРС, связывается фактор ТFIIN, после чего начинается проверка статуса поврежденной ДНК как субстрата NER – наличия объемной химической модификации в обнаруженном ХРС участке ДНК с нарушенной регулярной структурой.

ПРОВЕРКА ПОВРЕЖДЕНИЯ И СБОРКА ГОТОВОГО К УДАЛЕНИЮ ПОВРЕЖДЕННОГО УЧАСТКА КОМПЛЕКСА

Фактор ТFIIN представляет собой многосубъединичный комплекс, в состав которого входят две хеликазы – ХРВ и ХРД, белки р62, р52, р44, р34 и р8, не обладающие ферментативной активностью, и комплекс CDK-активирующей киназы САК (циклин

Н, Cdk7, Mat1). В 3D-модели ТFIIN человека, созданной с использованием результатов электронно-микроскопического анализа, основной набор белков формирует несколько удлиненную кольцеобразную структуру (16 × 12.5 × 7.5 нм) с отверстием, диаметр которого (2.6–3.4 нм) достаточен для того, чтобы вместить двухцепочечную спираль ДНК [47]. Со структурой, формируемой коровыми белками, через ХРД соединен САК-субкомплекс, образуя выступ на внешней стороне кольца. Самая маленькая субъединица р8 (TTDA) также входит в состав кора. Зависимое от ХРС привлечение ТFIIN к повреждению контролируется прежде всего непосредственными контактами с ХРВ и р62-субъединицей (рис. 2). Кольцеобразная структура ТFIIN охватывает дцДНК с 5'-стороны от повреждения, при этом высвобождается киназный субкомплекс. Наиболее очевидным следствием присоединения ТFIIN является раскручивание двойной спирали ДНК вокруг повреждения, катализируемое двумя специализированными хеликазами ХРВ (3'→5') и ХРД (5'→3'). Формируется асимметричный участок разошедшихся цепей длиной примерно 27 нуклеотидов (22 нуклеотида с 5'-стороны от повреждения и 5 – с 3'-стороны). Этот этап проходит с использованием энергии макроэргической связи АТФ [48–51]. Механизм формирования одноцепочечных участков ДНК вокруг повреждения и проверки наличия модификации стал более понятным благодаря данным о структуре факторов ХРВ и ХРД, полученным при изучении кристаллической структуры белков-аналогов из архей [52–54], и результатам анализа структуры С-концевого фрагмента ХРВ человека [53]. Анализ структуры кристаллов ХРВ *Archaeoglobus fulgidus* показал, что этот белок содержит два геликазных домена – HD1 и HD2, в которых располагаются семь консервативных геликазных мотивов. Выявлены также два новых структурных мотива – RED в HD1, который состоит из трех заряженных аминокислотных остатков Arg, Glu и Asp, и мотив «большой палец» (thumb-like motif ThM) в HD2, аналогичный найденному в T7-ДНК-полимеразе. Аналоги человеческого ХРД из трех разновидностей архей (*Thermoplasma acidophilum*, *Sulfolobus tokodaii*, *S. acidocaldarius*) содержат по четыре домена, включая HD1, HD2, Arch-домен и уникальный 4FeS-домен, содержащий Fe-4S-кластер, впервые обнаруженный в структуре геликазы [54–56]. Детали механизма взаимодействия ХРД с ДНК и структуру формируемых комплексов активно изучали на моделях рекомбинантных геликаз архей. Была создана модель взаимодействия ХРД с ДНК, в соответствии с которой оцДНК связывается в бороздке, находящейся между доменами Arch и HD2, и проходит сквозь отверстие (пору) в глобуле, диаметр которой

достаточно велик для свободного продвижения геликазы по ДНК. Можно было предполагать, что объемные аддукты, репарируемые системой NER, могут блокировать транслокацию XPD по расположенной таким образом оцДНК. Такое предположение согласуется, в частности, с ранее полученными данными

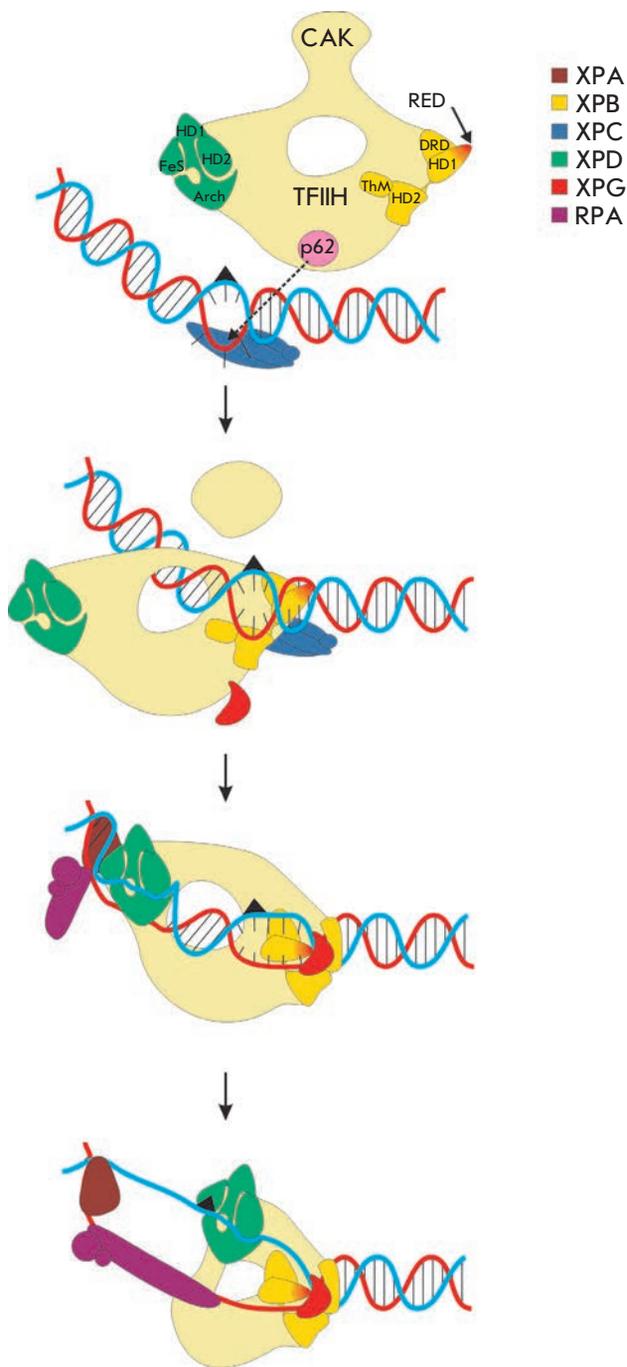


Рис. 2. Схема двустадийного процесса узнавания повреждения

об ингибировании активности дрожжевого аналога XPD – геликазы *rad3*, при взаимодействии с объемным повреждением [57]. С использованием аналога XPD из *Ferroplasma acidarmanus*, работающего в форме мономера, но близкого по структуре к белку человека, было показано, что хеликаза останавливается при встрече с повреждением в цепи, по которой транслоцируется в направлении 5'→3'. При этом, в отличие от хеликазной активности, которая ингибируется, у связавшегося с повреждением XPD сохраняется и даже возрастает АТФ-азная активность. Кроме того, фермент диссоциирует от субстрата, если CPD расположен в комплементарной 3'→5'-цепи [58]. На основе данных, полученных при анализе кристаллических структур архейных аналогов XPD, неоднократно высказывалось предположение, что наличие соответствующей модификации в ДНК окончательно проверяется при связывании основания в кармане, расположенном на поверхности XPD, вблизи «туннеля» в структуре белка, через который протягивается цепь ДНК [54, 56, 58]. Окончательно подтвердить, что XPD-субъединица TFIIH выполняет функцию проверки наличия повреждения, позволили результаты изучения взаимодействия мутантных белков XPD человека с ДНК, содержащей УФ-повреждения. Мутации вводили в участок полипептида, располагающийся в месте перехода ДНК-связывающего канала в пору (а.о. Y192A и R196E). При этом аминокислотные остатки, непосредственно вовлеченные в хеликазную и АТФ-азную активность, не затрагивались. Мутантные белки сохраняли способность раскручивать дцДНК, но не различали поврежденные и неповрежденные ДНК. При замене этих остатков снижалась способность XPD формировать белковые комплексы – стабильные интермедиаты узнавания. Таким образом, показано, что эти аминокислотные остатки входят во фрагмент полипептида, формирующего сенсорный карман белка XPD человека. Расположение кармана совпадает с расположением в аналоге из архея *T. acidophilum* [59]. В отличие от XPD, фактор XPB, продвигающийся по ДНК в направлении 3'→5', проявляет свойства скорее АТФ-азы с минорной хеликазной активностью. В составе хеликазных доменов XPB впервые выявлены новые мотивы RED (в HD1) и Thumb (в HD2) [52–55]. Активность XPB стимулируется субъединицей p52 TFIIH [60]. Именно XPB первым связывается с изогнутой ДНК, находящейся в комплексе с XPC. Взаимодействуя с небольшим участком дестабилизированной неповрежденной цепи дцДНК (примерно 5 нуклеотидов с 3'-стороны), XPB разворачивает один из двух хеликазных доменов на 170°, увлекая за собой ДНК, сводя хеликазные домены 1 и 2, соединенные подвижным неструктурированным фрагментом, вы-

полняющим роль шарнира, и формируя сайт связывания АТФ. Затем при помощи короткого мотива RED, состоящего из заряженных аминокислот, ХРВ внедряется между цепями дцДНК, раскручивает ее примерно на 5 нуклеотидов в направлении 3'→5' и предварительно фиксирует ТФПН на ДНК. Кольцо ТФПН при этом наклоняется относительно оси спирали ДНК. При этом ХРД получает возможность контактировать с участком поврежденной цепи, удаленным в 5'-сторону от повреждения примерно на 22 нуклеотида, и раскручивает ДНК в направлении 5'→3', передвигаясь вдоль цепи за счет энергии гидролиза АТФ и формируя асимметричный «пузырь». При встрече с повреждением ХРД останавливается. Происходит характерная для объемных модификаций иммобилизация ХРД, а значит и ТФПН, на ДНК [50, 60, 61].

Если статус поврежденной ДНК как субстрата NER подтверждается появлением долгоживущей открытой нуклеопротеиновой структуры, включающей ТФПН, то начинается следующий этап репарации. Формируется более стабильный и протяженный комплекс, готовый к удалению поврежденного участка ДНК (англ. «preincision complex»). Происходит присоединение к комплексу факторов RPA и XPA, координированное взаимодействием между этими факторами и с субъединицами ТФПН.

RPA – трехсубъединичный белковый фактор, имеющий наибольшее сродство к одноцепочечным ДНК. RPA, участвующий во многих процессах метаболизма ДНК, представлен в клетке большим количеством копий [62]. Присутствие RPA необходимо для формирования «preincision»-комплекса и последующего удаления участка поврежденной ДНК [1]. Расположенные в субъединицах р70 и р32 RPA пять ДНК-связывающих доменов, обладающих различным сродством к субстрату, обеспечивают формирование с оцДНК комплексов с различной архитектурой и прочностью. Эти домены взаимодействуют с ДНК полярно (в направлении 5'→3') [63, 64]. В готовом к расщеплению комплексе RPA занимает примерно 30 нуклеотидов неповрежденной цепи напротив участка, содержащего повреждение, предохраняя ДНК от нелегитимной деградации и способствуя точному позиционированию эндонуклеаз XPG и ERCC1-XPF.

XPA, как и XPC, обладает повышенным сродством к ДНК с особенностями вторичной структуры, в частности, к индуцированным объемным повреждением изломам спирали ДНК, что ранее послужило основанием для рассмотрения этого фактора (или его комплекса с RPA) в качестве претендента на роль сенсора повреждения, либо белка-контролера наличия модификации [1, 65, 66]. Однако, в отличие

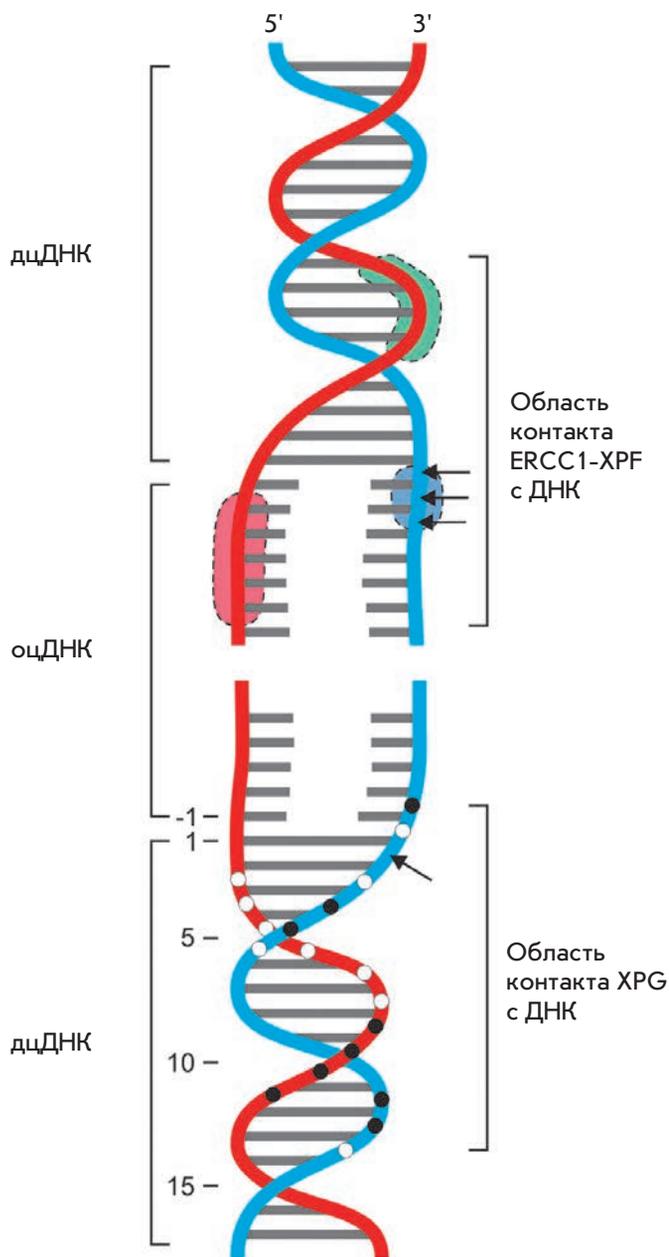
от XPC, фактор XPA взаимодействует предпочтительно с поврежденной цепью и обладает гораздо более низким сродством к ДНК-аналогам субстратов и интермедиатов NER [65, 66]. Небольшой и функционирующий в клетке в форме мономера XPA имеет достаточно сложную доменную структуру. Анализ ДНК-связывающего фрагмента XPA, в формирование которого вовлечены аминокислотные остатки с 98 по 219, проведенный с использованием ЯМР-спектроскопии, выявил на поверхности белка, ближе к С-концу ДНК-связывающего домена, положительно заряженную бороздку, состоящую примерно из 60 а.о. Геометрические параметры этой бороздки позволяют связывать как одноцепочечную, так и двухцепочечную ДНК [67, 68]. В структуре ДНК-связывающего домена XPA выделяют кислый субдомен (остатки 105–129), содержащий «цинковый палец», и С-концевой субдомен (а.о. 138–209). При этом мотив «цинковый палец» не участвует в связывании с ДНК, он необходим для взаимодействия с RPA [67]. С помощью сайт-направленного мутагенеза идентифицированы домены специфического взаимодействия XPA с целым рядом коровых полипептидов NER: RPA70, RPA32 (N-концевой и центральный фрагменты XPA), ERCC1 (короткий участок, прилегающий к N-концевому фрагменту XPA) и ТФПН (С-концевой фрагмент XPA). Взаимодействие XPA-RPA способствует более эффективному связыванию с ДНК обоих факторов [65, 66, 69], а взаимодействие с белками комплекса, уже сформированного на ДНК, раскрытой вокруг повреждения, обеспечивает высокий уровень селективности. Такие свойства XPA обусловлены особенностями его структуры, позволяющей легко менять конформацию и обеспечивающей эффективное взаимодействие с поврежденной ДНК в процессе формирования комплекса, готового к расщеплению. В настоящее время XPA рассматривается прежде всего как сенсор аномального электростатического потенциала, возникающего при перегибах отрицательно заряженного сахарофосфатного остова ДНК. Исследования взаимодействия серии мутантных форм XPA с модифицированными ДНК, проведенные с применением методов торможения в геле, фотопришивки к ДНК, содержащей арилазидную модификацию, позволили определить аминокислотные остатки, особенно важные для эффективного функционирования XPA [70]. С помощью аффинной модификации идентифицирована также область поврежденной цепи ДНК, с которой контактирует XPA. Использование серии ДНК-зондов с различным взаимным расположением имитирующего повреждение дезоксиуридина, содержащего объемную модификацию на основе флуоресцеина и фотоактивного 5-J-dU, позволило показать, что большая часть контактов XPA

с ДНК находится вблизи перехода оцДНК/дцДНК с 5'-стороны от повреждения [69]. Способность ХРА специфически взаимодействовать не только с ДНК, но и со многими белками NER (RPA, ERCC1-ХРФ, ТФИИ, ХРС) определяет его важную структурную и функциональную роль в сборке готового к проведению двойной инцизии комплекса [71–74].

УДАЛЕНИЕ ИЗ ДНК ФРАГМЕНТА, СОДЕРЖАЩЕГО ПОВРЕЖДЕНИЕ

Фактор ХРГ, выполняющий в процессе репарации функции 3'-эндонуклеазы, привлекается к району повреждения независимо от ХРА и RPA, через взаимодействие с ТФИИ [74–76]. Связывание ХРГ с ДНК и одновременное высвобождение ХРС завершают формирование на ДНК комплекса, готового к вырезанию поврежденного участка. ХРГ на этом этапе выполняет структурные функции, стабилизируя открытый комплекс, и не проявляет эндонуклеазной активности. Детерминантой характера взаимодействия ХРГ с ДНК-субстратами в процессе NER служит переход оцДНК/дцДНК с 3'-стороны от повреждения. С использованием различных методик футпринтинга и метода торможения в геле было показано, что ХРГ, как и другие члены семейства флэп-эндонуклеазы 1, взаимодействует с двухцепочечным участком модельных структур через неспецифические контакты с фосфодиэфирным остовом (рис. 3). Эти контакты охватывают примерно 12 нуклеотидов обеих цепей и расположены с внешней стороны В-спирали ДНК. Дополнительные немногочисленные контакты ХРГ в одноцепочечных участках модельных субстратов (в поврежденной цепи это три контакта с фосфодиэфирным остовом, характер контактов ХРГ с неповрежденной цепью пока не выяснен) слабо влияют на связывание. При этом необходимым условием для проявления ХРГ эндонуклеазной активности является наличие одноцепочечного участка поврежденной цепи вблизи места связывания белка [77, 78].

Фактор ХРФ – структурно-специфичная эндонуклеаза, которая расщепляет ДНК в месте перехода дцДНК/оцДНК с 5'-стороны от повреждения и функционирует в NER в составе гетеродимера с белком ERCC1. Облигатный гетеродимер ERCC1-ХРФ вовлекается в комплекс через взаимодействие ERCC1 с ХРА и производит разрыв в поврежденной цепи с 5'-стороны от повреждения. В ERCC1-ХРФ выявлено несколько доменов, обеспечивающих его функционирование [79–83]. Показано, что обе субъединицы содержат вблизи С-концов домены спираль-шпилька-спираль (HhH), необходимые для формирования гетеродимера [84]. Активный центр ХРФ представляет собой консервативный нуклеазный



- Область взаимодействия XPF с неповрежденной цепью
 - Область взаимодействия каталитического центра XPF с поврежденной цепью
 - Область взаимодействия ERCC1 с двухцепочечным участком ДНК
 - Участок сильного взаимодействия XPG с фосфатными группами ДНК
 - Участок слабого взаимодействия XPG с фосфатными группами ДНК
 - Поврежденная цепь ДНК
 - Неповрежденная цепь ДНК
- Стрелками показаны места возможного расщепления цепи ДНК

Рис. 3. Схематическое изображение контактов ХРФ-ERCC1 и ХРГ с ДНК в районе повреждения

домен, расположенный рядом с доменом HhH [79]. Центральный домен ERCC1 структурно гомологичен нуклеазному домену XPF, однако вместо активного центра с кислыми остатками он содержит бороздку, выстланную остатками основных и ароматических аминокислот. Этот структурный элемент взаимодействует с ХРА, осуществляя связь между ERCC1-XPF и остальной машиной NER [81, 83]. С использованием индивидуальных рекомбинантных доменов XPF, а также по данным изучения архейных XPF-белков установлено, что эти пять доменов участвуют во взаимодействии с ДНК [79–81]. Методами масс-спектрометрии, ЯМР-спектроскопии и *in vitro*-анализа связывания белка с ДНК определена структура комплекса С-концевого HhH-домена белка XPF с оцДНК в растворе [78]. Показано, что стабильный комплекс с оцДНК образует гомодимер HhH. При этом ДНК закручена вокруг белка так, что взаимодействия белок–ДНК располагаются вдоль фосфатного остова молекулы. Положительно заряженный участок во второй спирали одного из HhH-мотивов контактирует с фосфатным остовом оцДНК. Эти данные в сочетании с опубликованными ранее [85] позволили построить модель комплекса ERCC1-XPF, которая объясняет позиционирование эндонуклеазы на месте перехода дцДНК/оцДНК с 5'-стороны от повреждения. Согласно этой модели, HhH-домен ERCC1 взаимодействует с двухцепочечной частью ДНК-структуры. С поврежденной цепью ДНК контактирует нуклеазный домен XPF. Контакты с неповрежденной цепью осуществляют HhH-домены XPF и ERCC1 (рис. 3).

Роль С-концевых ДНК-связывающих доменов во взаимодействии гетеродимера с ДНК-субстратами была исследована с помощью мутационного анализа в контексте полноразмерного ERCC1-XPF. Оказалось, что мутации в одном домене не снижают заметно активность системы NER *in vitro* и *in vivo*. Нарушение работы системы NER происходит при введении мутаций в несколько доменов, причем существует иерархия важности отдельных доменов [84]. В присутствии каталитически неактивной XPG происходит катализируемое ERCC1-XPF расщепление поврежденной цепи ДНК с 5'-стороны (в 15–25 нуклеотидах от повреждения) с образованием свободной 3'-гидроксильной группы, необходимой для инициации репаративного синтеза и появления подвижного одноцепочечного фрагмента, содержащего повреждение. Происходящие изменения структуры белково-нуклеинового комплекса дают возможность XPG проявлять каталитическую активность [78]. Затем происходит расщепление ДНК с 3'-стороны (в 3–9 нуклеотидах от повреждения), завершающее процесс эксцизии поврежденного участка. В структуре

XPG, остающегося связанным с ДНК некоторое время после эксцизии, имеются мотивы, обеспечивающие специфическое взаимодействие с PCNA (ядерный антиген пролиферирующих клеток). Предполагается, что XPG может способствовать эффективности и процессивности репаративного синтеза [1, 2].

РЕПАРАТИВНЫЙ СИНТЕЗ

Репаративный синтез и лигирование цепи ДНК осуществляют ферменты и белковые факторы, которые также участвуют в процессе репликации ДНК. Для синтеза ДНК необходимы ДНК-полимеразы δ или ϵ и факторы RFC, PCNA и RPA. Комплекс RFC, состоящий из пяти разных субъединиц, способствует АТР-зависимому «нализыванию» PCNA на ДНК вблизи 3'-конца фрагмента ДНК, фланкирующего брешь, которая образуется в результате эксцизии. PCNA – гомотримерный комплекс, формирующий кольцеобразную структуру, которая скользит вдоль ДНК и взаимодействует с ДНК-полимеразами, способствуя повышению процессивности этих ферментов [1].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Процесс NER управляется множественными слабыми взаимодействиями между белками и ДНК-субстратами, а также белок-белковыми взаимодействиями в нуклеопротеиновых комплексах. После того как в процессе первичного узнавания поврежденного участка в эукариотических клетках формируется прочный комплекс ХРС/ДНК, NER осуществляется фактически репаросомой – состоящим из большого числа субъединиц комплексом переменного состава и архитектуры. Каждая из субъединиц этого комплекса по отдельности не обладает достаточным сродством и селективностью по отношению к субстрату – ДНК, содержащей объемное повреждение. Ситуация меняется при формировании в районе повреждения специфических белковых комплексов. Белки NER в этих комплексах объединены находящейся в процессинге ДНК. До момента формирования стабильной структуры, готовой к удалению повреждения, и начала эксцизии в пределах двух-трех витков ДНК должны быть точно позиционированы 18 полипептидов. Структура участвующих в NER белков обеспечивает как возможность контактов с объединяющим их субстратом – ДНК, так и возможность динамических специфических белок-белковых взаимодействий, иногда взаимоисключающих. Смена контактов, которые может осуществлять один и тот же белок, – один из механизмов, регулирующих протекание процесса и производящих тонкую подстройку в репаративных комплексах, обеспечивая высокую точность протекания процесса эксцизионной репа-

рации нуклеотидов в ДНК. Изучение состава и архитектуры белково-нуклеиновых комплексов NER как *in vitro*, так и *in vivo*, требует применения широкого арсенала методов и модельных систем различной степени сложности. ●

Работа поддержана РФФИ (грант № 12-04-00487а), РАН (программы фундаментальных исследований «Молекулярная и клеточная биология»), Министерством образования и науки РФ (НШ-420.2014.4).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Gillet L.C., Schärer O.D. // *Chem. Rev.* 2006. V. 106. № 2. P. 253–276.
2. Sugawara K. // *Mutat. Res.* 2010. V. 685. № 1. P. 29–37.
3. Volker M., Mone M.J., Karmakar P., van Hoffen A., Schul W., Vermeulen W., Hoeijmakers J.H., van Driel R., van Zeeland A.A., Mullenders L.H. // *Mol. Cell.* 2001. V. 8. № 1. P. 213–224.
4. Lehmann A.R. // *Biochimie.* 2003. V. 85. P. 1101–1111.
5. Hanawalt P.C., Spivak G. // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2008. V. 9. № 11. P. 958–970.
6. Friedberg E.C. // *Nat. Rev. Cancer.* 2001. V. 1. P. 22–33.
7. Hoeijmakers J.H. // *Nature.* 2001. V. 411. № 6835. P. 366–374.
8. Kuraoka I., Bender C., Romieu A., Cadet J., Wood R.D., Lindahl T. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2000. V. 97. № 8. P. 3832–3837.
9. D'Errico M., Parlanti E., Teson M., de Jesus B.M., Degan P., Calcagnile A., Jaruga P., BJORAS M., Crescenzi M., Pedrini A.M., et al. // *EMBO J.* 2006. V. 25. № 18. P. 4305–4315.
10. Johnson K.A., Fink S.P., Marnett L.J. // *J. Biol. Chem.* 1997. V. 272. № 17. P. 11434–11438.
11. Luijsterburg M.S., Bornstaedt G., von Gourdin A.M., Politi A.Z., Moné M.J., Warmerdam D.O., Goedhart J., Vermeulen W., van Driel R., Höfer T. // *J. Cell Biol.* 2010. V. 189. № 17. P. 445–463.
12. Svirar D., Goellner E.M., Almeida K.H., Sobol R.W. // *Antioxid. Redox Signal.* 2011. V. 14. № 12. P. 2491–2507.
13. Yang W. // *Cell Research.* 2008. V. 18. № 1. P. 184–197.
14. Isaacs R.J., Spielmann H.P. // *DNA Repair (Amst.)*. 2004. V. 3. № 5. P. 455–464.
15. Hess M.T., Schwitter U., Petretta M., Giese B., Naegeli H. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1997. V. 94. № 13. P. 6664–6669.
16. Buterin T., Meyer C., Giese B., Naegeli H. // *Chem. Biol.* 2005. V. 12. № 8. P. 913–922.
17. Sugawara K., Ng J., Masutani C., Iwai S., van der Spek P., Eker A., Hanaoka F., Bootsma D., Hoeijmakers J.H. // *Mol. Cell.* 1998. V. 2. № 2. P. 223–232.
18. Rademakers S., Volker M., Hoogstraten D., Nigg A.L., Moné M.J., van Zeeland A.A., Hoeijmakers J.H., Houtsmuller A.B., Vermeulen W. // *Mol. Cell Biol.* 2003. V. 23. № 16. P. 5755–5767.
19. Sugawara K., Shimizu Y., Shigenori I., Iwai S., Hanaoka F. // *DNA Repair.* 2002. V. 12. № 1. P. 95–107.
20. Nocentini S., Coin F., Saijo M., Tanaka K., Egly J.M. // *J. Biol. Chem.* 1997. V. 272. № 37. P. 22991–22994.
21. Missura M., Buterin T., Hindges R., Hübscher U., Kaspárková J., Brabec V., Naegeli H. // *EMBO J.* 2001. V. 20. № 13. P. 3554–3564.
22. Hermanson-Miller I.L., Turchi J.J. // *Biochemistry.* 2002. V. 41. № 7. P. 2402–2408.
23. Thoma B.S., Wakasugi M., Christensen J., Reddy M.C., Vasquez K.M. // *Nucl. Acids Res.* 2005. V. 33. № 9. P. 2993–3001.
24. Sugawara K., Okamoto T., Shimizu Y., Masutani C., Iwai S., Hanaoka F. // *Genes Dev.* 2001. V. 15. № 5. P. 507–521.
25. Hoogstraten D., Bergink S., Ng J., Verbiest V.H., Luijsterburg M.S., Geverts B., Raams A., Dinant C., Hoeijmakers J.H., Vermeulen W., Houtsmuller A.B. // *J. Cell Sci.* 2008. V. 121. № 16. P. 2850–2859.
26. Reardon J.T., Sancar A. // *Genes Dev.* 2003. V. 17. № 20. P. 2539–2551.
27. Fitch M.E., Nakajima S., Yasui A., Ford J.M. // *J. Biol. Chem.* 2003. V. 278. № 47. P. 46906–46910.
28. Sugawara K., Okuda Y., Saijo M., Nishi R., Matsuda N., Chu G., Mori T., Iwai S., Tanaka K., Hanaoka F. // *Cell.* 2005. V. 121. № 3. P. 387–400.
29. Scrima A., Koníčková R., Czyzewski B.K., Kawasaki Y., Jeffrey P.D., Groisman R., Nakatani Y., Iwai S., Pavletich N.P., Thomä N.H. // *Cell.* 2008. V. 135. № 7. P. 1213–1223.
30. Min J.H., Pavletich N.P. // *Nature.* 2007. V. 449. № 7162. P. 570–575.
31. Murzin A.G. // *EMBO J.* 1993. V. 12. № 3. P. 861–867.
32. Janičević A., Sugawara K., Shimizu Y., Hanaoka F., Wijgers N., Djurica M., Hoeijmakers J.H., Wyman C. // *DNA Repair (Amst.)*. 2003. V. 2. № 3. P. 325–336.
33. Mocquet V., Kropachev K., Kolbanovskiy M., Kolbanovskiy A., Tapias A., Cai Y., Broyde S., Geacintov N.E., Egly J.M. // *EMBO J.* 2007. V. 26. № 12. P. 2923–2932.
34. Krasikova Y.S., Rechkunova N.I., Maltseva E.A., Pestrjakov P.E., Petrusseva I.O., Sugawara K., Chen X., Min J.H., Lavrik O.I. // *J. Biol. Chem.* 2013. V. 288. № 15. P. 10936–10947.
35. Bunick C.G., Miller M.R., Fuller B.E., Fanning E., Chazin W.J. // *Biochemistry.* 2006. V. 45. № 50. P. 14965–14979.
36. Maillard O., Solyom S., Naegeli H. // *PLoS Biol.* 2007. V. 5. № 4. e79.
37. Camenisch U., Trutlein D., Clement F.C., Fei J., Leitenstorfer A., Ferrando-May E., Naegeli H. // *EMBO J.* 2009. V. 28. № 16. P. 2387–2399.
38. Clement F.C., Camenisch U., Fei J., Kaczmarek N., Mathieu N., Naegeli H. // *Mutat. Res.* 2010. V. 685. № 1. P. 21–28.
39. Sugawara K., Akagi J., Nishi R., Iwai S., Hanaoka F. // *Mol. Cell.* 2009. V. 36. № 4. P. 642–653.
40. Araki M., Masutani C., Takemura M., Uchida A., Sugawara K., Kondoh J., Ohkuma Y., Hanaoka F. // *J. Biol. Chem.* 2001. V. 276. № 22. P. 18665–18672.
41. Nishi R., Okuda Y., Watanabe E., Mori T., Iwai S., Masutani C., Sugawara K., Hanaoka F. // *Mol. Cell Biol.* 2005. V. 25. № 13. P. 5664–5674.
42. Maltseva E.A., Rechkunova N.I., Gillet L.C., Petrusseva I.O., Schärer O.D., Lavrik O.I. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2007. V. 1770. № 5. P. 781–789.
43. Maltseva E.A., Rechkunova N.I., Petrusseva I.O., Vermeulen W., Schärer O.D., Lavrik O.I. // *Bioorg. Chem.* 2008. V. 36. № 2. P. 77–84.
44. Евдокимов А.Н., Петруссева И.О., Пестряков П.Е., Лаврик О.И. // *Биохимия.* 2011. Т. 76. № 1. С. 188–200.
45. Neher T.M., Rechkunova N.I., Lavrik O.I., Turchi J.J. // *Biochemistry.* 2010. V. 49. № 4. P. 669–678.
46. Bergink S., Toussaint W., Luijsterburg M.S., Dinant C., Alekseev S., Hoeijmakers J.H., Dantuma N.P., Houtsmuller A.B., Vermeulen W. // *J. Cell Biol.* 2012. V. 196. № 6. P. 681–688.
47. Schultz P., Fribourg S., Poterszman A., Mallouh V., Moras D., Egly J.M. // *Cell.* 2000. V. 102. № 5. P. 599–606.
48. Araújo S.J., Nigg E.A., Wood R.D. // *Mol. Cell Biol.* 2001. V. 21. № 7. P. 2281–2291.

49. Oksenykh V., de Jesus B.B., Zhovmer A., Egly J.M., Coin F. // *EMBO J.* 2009. V. 28. № 19. P. 2971–2980.
50. Egly J.M., Coin F. // *DNA Repair.* 2011. V. 10. № 7. P. 714–721.
51. Compe E., Egly J.M. // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2012. V. 13. № 6. P. 343–354.
52. Fan L., Arvai A.S., Cooper P.K., Iwai S., Hanaoka F., Tainer J.A. // *Mol. Cell.* 2006. V. 22. № 1. P. 27–37.
53. Hilario E., Li Y., Nobumori Y., Liu X., Fan L. // *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 2013. V. 69. № 2. P. 237–246.
54. Wolski S.C., Kuper J., Hazelmann P., Truglio J.J., Croteau D.L., van Houten B., Kisker C. // *PLoS Biol.* 2008. V. 6. № 6. e149.
55. Fan L., Fuss J.O., Cheng Q.J., Arvai A.S., Hammel M., Roberts V.A., Cooper P.K., Tainer J.A. // *Cell.* 2008. V. 133. № 5. P. 789–800.
56. Kuper J., Wolski S.C., Michels G., Kisker C. // *EMBO J.* 2012. V. 31. № 2. P. 494–502.
57. Naegeli H., Modrich P., Friedberg E.C. // *J. Biol. Chem.* 1993. V. 268. № 14. P. 10386–10392.
58. Mathieu N., Kaczmarek N., Naegeli H. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2010. V. 107. № 41. P. 17545–17550.
59. Mathieu N., Kaczmarek N., Rüttemann P., Luch A., Naegeli H. // *Curr. Biol.* 2013. V. 23. № 3. P. 204–212.
60. Oksenykh V., Coin F. // *Cell Cycle.* 2010. V. 9. № 1. P. 90–96.
61. Fan L. How two helicases work together within the TFIIH complex, a perspective from structural studies of XPB and XPD helicases. Berlin-Heidelberg: Higher Education Press and Springer-Verlag, 2013. V. 1. 6 p.
62. Fanning E., Klimovic V., Nager A.R. // *Nucl. Acids Res.* 2006. V. 34. № 15. P. 4126–4137.
63. De Laat W.L., Appeldoorn E., Sugasawa K., Weterings E., Jaspers N.G.J., Hoeijmakers J. // *Genes Dev.* 1998. V. 12. № 16. P. 2598–2609.
64. Kolpashchikov D.M., Khodyreva S.N., Khlimankov D.Y., Wold M.S., Favre A., Lavrik O.I. // *Nucl. Acids Res.* 2001. V. 29. № 2. P. 373–379.
65. Hey T., Lipps G., Krauss G. // *Biochemistry.* 2001. V. 40. № 9. P. 2901–2910.
66. Patrick S.M., Turchi J.J. // *J. Biol. Chem.* 2002. V. 277. № 18. P. 16096–17101.
67. Ikegami T., Kuraoka I., Saijo M., Kodo N., Kyogoku Y., Morikawa K., Tanaka K., Shirakawa M. // *Nat. Struct. Biol.* 1998. V. 5. № 8. P. 701–706.
68. Buchko G.W., Ni S., Thrall B.D., Kennedy M.A. // *Nucl. Acids Res.* 1998. V. 26. № 11. P. 2779–2788.
69. Krasikova Y.S., Rechkunova N.I., Maltseva E.A., Petrusheva I.O., Lavrik O.I. // *Nucl. Acids Res.* 2010. V. 38. № 22. P. 8083–8094.
70. Camenisch U., Dip R., Vitanescu M., Naegeli H. // *DNA Repair (Amst.)* 2007. V. 6. № 12. P. 1819–1828.
71. Missura M., Buterin T., Hindges R., Hübscher U., Kaspárková J., Brabec V., Naegeli H. // *EMBO J.* 2001. V. 20. № 13. P. 3554–3564.
72. Thoma B.S., Vasquez K.M. // *Mol. Carcinog.* 2003. V. 38. № 1. P. 1–13.
73. Iakoucheva L.M., Walker R.K., van Houten B., Ackerman E.J. // *Biochemistry.* 2002. V. 41. № 2. P. 131–143.
74. Park C.H., Sancar A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1994. V. 91. № 11. P. 5017–5021.
75. Riedl T., Hanaoka F., Egly J.M. // *EMBO J.* 2003. V. 22. № 19. P. 5293–5303.
76. Zotter A., Luijsterburg M.S., Warmerdam D.O., Ibrahim S., Nigg A., van Cappellen W.A., Hoeijmakers J.H., van Driel R., Vermeulen W., Houtsmuller A.B. // *Mol. Cell Biol.* 2006. V. 23. № 23. P. 8868–8879.
77. Hohl M., Thorel F., Clarkson S.G., Schärer O.D. // *J. Biol. Chem.* 2003. V. 278. P. 19500–19508.
78. Hohl M., Dunand-Sauthier I., Staresincic L., Jaquier-Gubler P., Thorel F., Modesti M., Clarkson S.G., Schärer O.D. // *Nucl. Acids Res.* 2007. V. 35. № 9. P. 3053–3063.
79. Enzlin J.H., Schärer O.D. // *EMBO J.* 2002. V. 21. P. 2045–2053.
80. Tsodikov O.V., Enzlin J.H., Schärer O.D., Ellenberger T. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2005. V. 102. № 32. P. 11236–11241.
81. Tsodikov O.V., Ivanov D., Orelli B., Staresincic L., Shoshani I., Oberman R., Schärer O.D., Wagner G., Ellenberger T. // *EMBO J.* 2007. V. 26. № 22. P. 4768–4776.
82. Tripsianes K., Folkers G., Ab E., Das D., Odijk H., Jaspers N.G., Hoeijmakers J.H., Kaptein R., Boelens R. // *Structure.* 2005. V. 13. № 12. P. 1849–1858.
83. Tripsianes K., Folkers G.E., Zheng C., Das D., Grinstead J.S., Kaptein R., Boelens R. // *Nucl. Acids Res.* 2007. V. 35. № 17. P. 5789–5798.
84. Das D., Folkers G.E., van Dijk M., Jaspers N.G.J., Hoeijmakers J.H.J., Kaptein R., Boelens R. // *Structure.* 2012. V. 20. № 4. P. 667–675.
85. Su Y., Orelli B., Madireddy A., Niedernhofer L.J., Schärer O.D. // *J. Biol. Chem.* 2012. V. 287. № 26. P. 21846–21855.