

РЕПАРАЦИЯ МЕЖЦЕПОЧЕЧНЫХ СШИВОК МОЛЕКУЛЫ ДНК

Е.В. Долгова¹, А.С. Лихачева², К.Е. Орищенко², Е.А. Алямкина¹,
С.С. Богачев², М.А. Шурдов³

¹ Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия;

² Учреждение Российской академии наук Институт цитологии и генетики
Сибирского отделения РАН, Новосибирск, Россия, e-mail: gorbi@bionet.nsc.ru;

³ ООО «Панаген»

В обзоре дается анализ литературы, в котором характеризуются процессы, протекающие при репарации межцепочечных сшивок, индуцированных кросслинквирующими цитостатиками. Описаны основные механизмы репарации межцепочечных сшивок у прокариот (*Escherichia coli*), дрожжей (*Saccharomyces cerevisiae*) и высших эукариот. Для млекопитающих дополнительно приведены некоторые экспериментально обоснованные схемы репарации межцепочечных сшивок, описанные в мировой литературе за последние пять лет.

Ключевые слова: циклофосфан, межцепочечная сшивка, FA/BRCA фактор, гомологичная рекомбинация, репарация, ERCC1-XPF, двухцепочечный разрыв.

Введение

Межцепочечные сшивки (МЦС) в молекуле ДНК представляют собой повреждения, имеющие признанное терапевтическое значение в онкологической практике. Именно такие повреждения, индуцируемые определенной группой цитостатиков, приводят к нарушениям в молекулярных процессах клетки, определяющим ее гибель. Противоопухолевый эффект цитостатиков этого ряда связан со свойством опухолевых клеток эффективно, наряду с любыми другими активно пролиферирующими клетками организма, захватывать молекулы цитостатического вещества. Доставленный в ядро опухолевой клетки цитостатик приводит к формированию МЦС. При этом подбирается такая концентрация активного вещества, что опухолевая и любая другая активно пролиферирующая клетка организма не в состоянии корректно осуществить репарацию всех индуцированных повреждений, что и определяет ее гибель.

Противоопухолевое действие кросслинквирующих цитостатиков определяет повышенный интерес как к изучению молекулярных событий, протекающих в клетке после попадания во внутренние компартменты цитостатического

препарата, так и к изучению самого процесса репарации МЦС.

В предлагаемом обзоре представлены молекулярные события, протекающие при репарации МЦС в клетках организмов, относящихся к различным эволюционным группам. Модели механизма репарации МЦС в клетках высших эукариот представляют собой на настоящий момент времени неустоявшуюся совокупность экспериментальных фактов. В связи с этим мы даем характеристику репаративных процессов при репарации МЦС эукариот в соответствии с представлениями различных авторов, не объединяя многочисленные схемы в одну обобщенную последовательность событий.

1. Цитостатические препараты. Механизм формирования МЦС

МЦС молекулы ДНК хромосомы, возникающие в результате действия химических алкилирующих агентов, являются в высшей степени губительными для эукариотической клетки. При дефектах в системах репарации достаточно одного такого повреждения для того, чтобы клетка вступила в aberrantный митоз, заканчивающийся, как правило, апоптотиче-

ской гибелью клетки (Magaña-Schwencke *et al.*, 1982). Для здоровой клетки предельным для выживания является количество МЦС от 100 до нескольких тысяч на одно клеточное ядро (Magaña-Schwencke *et al.*, 1982; Akkari *et al.*, 2000). Цитостатики, вызывающие МЦС, широко применяются в онкологической практике как агенты, легко доставляемые в опухолевые клетки и индуцирующие МЦС. К таким цитостатикам относятся мустин, циклофосфан (ЦФ), псорален, митомицин С, препараты платины, хлорбутин и т. д. (Dalbiès *et al.*, 1994; Kasparikova *et al.*, 2002). Механизм действия кросслинкующего цитостатика определяется его химическим строением. В общем случае все кросслинкующие цитостатики интеркалируют в молекулу ДНК и формируют ковалентно связанные аддукты с находящимися в непосредственной близости нуклеотидами, расположенными на разных цепях нити ДНК.

Мустин (нитроген мустард) – метил-бис-(2-хлорэтил)-амин, стал первым веществом, использовавшимся в систематической терапии (рис. 1).

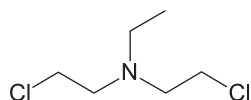


Рис. 1. Мустин.

Метил-бис-(2-хлорэтил)-амин взаимодействует с N-7 атомом гуанина и в меньшей степени с N-3 атомом аденина. Наиболее предпочтительной для атаки является последовательность 5'-GNC-3'/3'-CNG-5', а также связь между ДНК и белком (McHugh *et al.*, 1999).

ЦФ, а также его изомер ифосфамид, относятся к алкилирующим противоопухолевым препаратам, широко используемым в онкологической клинике. ЦФ также находит применение как иммунодепрессант при лечении аутоиммунных заболеваний и при трансплантации аллогенного костного мозга.

Фармакологический эффект ЦФ определяется его метаболитами, поскольку сам по себе он не проявляет цитостатической активности. К настоящему времени хорошо изучены пути метаболизма ЦФ, приводящие как к его активации, так и к инактивации, а также вещества, ускоряющие эти процессы или препятствующие им.

Метаболизм ЦФ у человека, а также у мышей и крыс осуществляется преимущественно в печени при участии системы ферментов цитохрома P450 (Fleming, 1997; Yu *et al.*, 1999).

Было доказано, что метаболизм ЦФ в печени может идти по двум альтернативным путям (рис. 2). ЦФ активируется в печени 4 реакциями гидроксирования, катализируемыми цитохромом P4502B и P4502C, или дезактивируется дехлорэтированием, катализируемым цитохромом P4503A (Yu *et al.*, 1999).

Первый путь – ЦФ-4-гидроксирование, приводящее к образованию 4-гидроксиЦФ, который в конечном итоге приводит к образованию фосфорамид мустарда, цитотоксичного метаболита. Из альдофосфамида, таутомерной формы 4-гидроксиЦФ, спонтанно образуются алкилирующий метаболит фосфорамид мустард и акролеин. Противоопухолевый эффект ЦФ связан, как считается в настоящее время, с активностью фосфорамид мустарда, в то время как акролеин ответственен за его токсическое воздействие на клетку. Акролеин проявляет сродство к SH-группам и взаимодействует с глутатионом и белками цитоплазмы. Фосфорамид мустард образует аддукты с пуриновыми основаниями ДНК, в особенности соседствующими с остатками гуанина, и приводит к возникновению перекрестных сшивок в двойной цепи молекулы ДНК (Yu *et al.*, 1999; De Silva *et al.*, 2000; Karle *et al.*, 2001).

Второй путь – ЦФ-N-дехлорэтирование, ведущее к образованию дехлорэтилЦФ и хлор-ацетальдегида в эквимолярных количествах. ДехлорэтилЦФ не приводит к образованию ДНК-кросслинкующих агентов в клетке и, таким образом, не обладает противоопухолевым действием. Однако активность хлор-ацетальдегида определяет различные виды токсического воздействия на клетку.

Известно, что разная роль индивидуальных P450 в клетке позволяет производить контроль между двумя альтернативными путями метаболизма ЦФ (Yu *et al.*, 1999).

Псорален (рис. 3) – еще один известный препарат, вызывающий образование МЦС в молекуле ДНК в присутствии ультрафиолетового излучения.

Взаимодействие псоралена с двуцепочечной ДНК является высокоспецифичным и легко

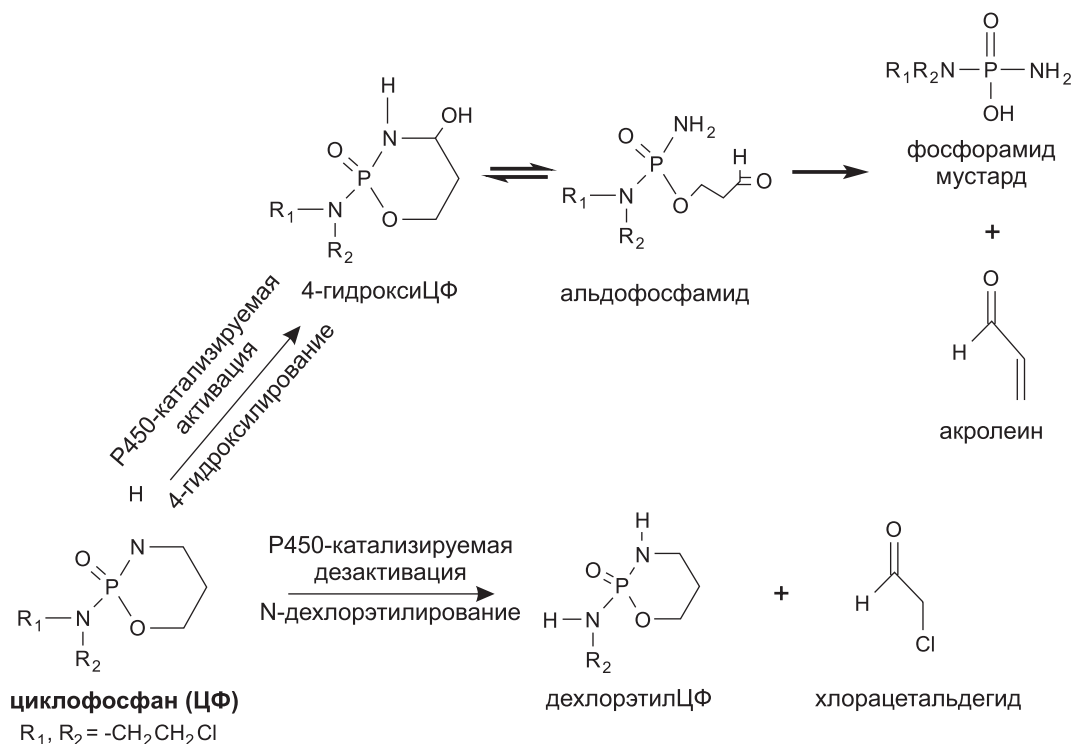


Рис. 2. Пути метаболизма ЦФ в организме (Yu *et al.*, 1999).

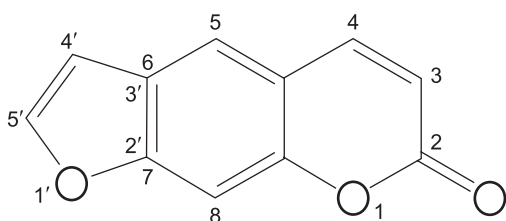


Рис. 3. Псорален.

контролируется при помощи изменения дозы облучения. Псорален – трехкольцевое асимметричное ароматическое соединение, которое интеркалирует в молекулу ДНК. Возбужденное при помощи длины волны 300–400 нм фурановое или пириновое кольцо псоралена формирует циклобутановый аддукт с атомами С-5 и С-6 соседнего тимина. Дальнейшее облучение ультрафиолетом вызывает поглощение второго фотона сформировавшимся моноаддуктом, что ведет к образованию ковалентной связи между пириновым кольцом и тиминкомplementарной цепи, в результате чего формируется МЦС. Энергия фотонов при дальнейшем облучении может быть использована для другой молекулы псоралена и формирования другой МЦС.

2. Основные молекулярные механизмы репарации МЦС

После возникновения МЦС в клетке активируются многочисленные системы контроля прогрессии клеточного цикла и репаративные механизмы, обеспечивающие репарацию губительных повреждений и восстановление целостности генома. Однако при терапии онкологических заболеваний концентрация цитостатических препаратов подбирается таким образом, что на одно клеточное ядро любой активно делящейся клетки приходится не менее 2500 МЦС. Такое количество МЦС обеспечивает практически неизбежную гибель клетки. При этом гибнет любая клетка, получившая цитостатик. Воздействие на опухолевую и любую другую клетку при такой обработке связано с невозможностью репарации всех возникших МЦС. Возможны две причины, по которым клетка не в состоянии репарировать все МЦС. Первая – это стерические препятствия, возникающие при нахождении гомологии в геноме, необходимой для репарации и восстановления некоторых

промежуточных интермедиатов. Вторая – недостаточное количество репаративных комплексов, обеспечивающих репарацию всех индуцированных МЦС. Тем не менее в клетке активируются репаративные процессы, и понимание механизма их работы является необходимым условием для правильного выбора режима терапевтического воздействия цитостатических препаратов. Репарация МЦС – сложный многостадийный процесс, имеющий много отличий у прокариот, дрожжей и высших эукариот.

2.1. Механизм репарации МЦС у прокариот

У *Escherichia coli* репарация МЦС требует функционирования двух систем репарации – эксцизионной репарации нуклеотидов (NER) и гомологичной рекомбинации (ГР) (рис. 4).

В настоящее время известно, что у *E. coli* при репарации МЦС, вызванных псораленом, эксцизионный комплекс UvrABC делает два надреза с 5'- и 3'-стороны от МЦС. Надрезы делаются на той цепи, где тимин ковалентно соединен с фурановым кольцом псоралена. В результате образуется олигонуклеотид длиной 11 нуклеотидов, ковалентно связанный через молекулу псоралена с интактной цепью молекулы ДНК. *In vitro* показано, что комплекс UvrABC остается связанным с ДНК, и что UvrD и PolI необходимы для освобождения молекулы ДНК. Во время этого процесса возможна физическая ассоциация между цепью ДНК и PolI, которая садится на образовавшийся 3'-конец и благодаря своей экзонуклеазной активности в направлении 5'→3' формирует брешь размером ~ 700 нуклеотидов. Такая брешь может образовываться и с левой стороны от МЦС в результате 3'→5' экзонуклеазной активности экзонуклеазы 3. Однако если реализуется последний вариант событий, то последующая рекомбинация будет проходить мимо сшивки и репарация не произойдет.

На отрезке, содержащем брешь, молекула ДНК состоит из одной цепи, с которой связывается белок рекомбинации RecA. При участии RecA осуществляется этап гомологичного спаривания с подходящей матрицей и индуцируется замещение цепей. На следующем этапе осуществляется репаративный синтез ДНК, за-

крывающий брешь. Далее происходят миграция цепей и разъединение кроссоверов. После кроссинговера цепь ДНК в месте присоединения олигонуклеотида разрезается с двух сторон от МЦС UvrABC системой в ходе второго раунда эксцизионной репарации. Образовавшаяся в ходе второго раунда эксцизии брешь закрывается в ходе репаративного синтеза и лигирования (Sinden, Cole, 1978; Van Houten *et al.*, 1986; Sladek *et al.*, 1989).

Кроме описанного пути репарации МЦС с привлечением механизма рекомбинации известен путь с участием синтеза через повреждение (TLS) по цепи с оставшимся аддуктом после первого раунда эксцизии (Berardini *et al.*, 1997).

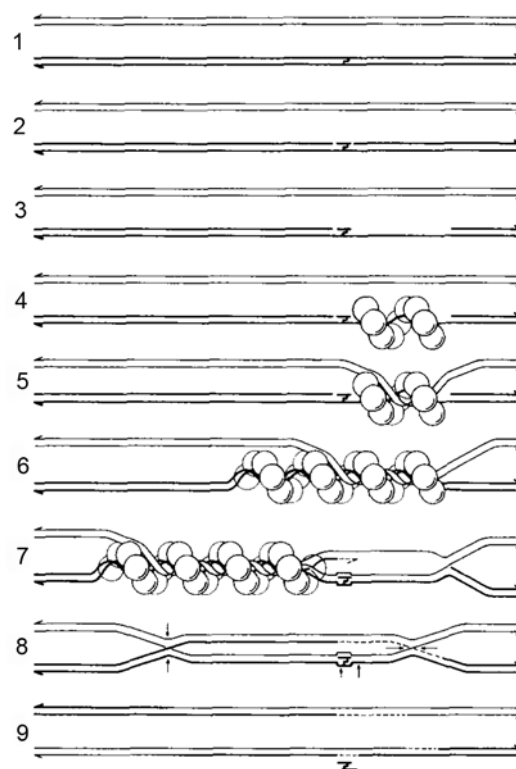


Рис. 4. Репарация МЦС у *E. coli*.

1 – образование МЦС; 2 – надрезание нити ДНК эксцизионным комплексом UvrABC; 3 – формирование бреши с 3'-стороны от МЦС в результате 5'→3' экзонуклеазной активности PolI; 4 – связывание с белком рекомбинации RecA; 5 – инициация контакта гомологичных цепей; 6 – гомологичное спаривание и обмен цепями; 7 – процесс репаративного синтеза ДНК; 8 – миграция цепей, разъединение кроссоверов; 9 – полное вырезание аддукта, репаративный синтез, лигирование цепи (Sladek *et al.*, 1989).

2.2. Механизм репарации МЦС у дрожжей

2.2.1. Основные системы и факторы репарации

У дрожжей также все три системы принимают участие в репарации МЦС. Это NER, ГР и TLS. Кроме этих трех систем описан фактор Pso2/Snm1, задействованный в репарационном процессе в промежутке между эксцизионной репарацией и ГР. Мутанты по генам любой из этих систем экстремально чувствительны к действию кросслинквирующих агентов.

Группа белков, относящаяся к системе NER, принадлежит Rad3 эпистатическому семейству. К ним относятся факторы Rad1, Rad2, Rad3, Rad4, Rad9, Rad10, Rad14. Фактор Rad2 разрезает одну цепь ДНК в непосредственной близости от МЦС с 3'-конца. Гетеродимер Rad10-Rad1 делает разрез той же нити ДНК в 5'-области от шивки. Другие факторы NER участвуют в механизмах, контролирующих прогрессию клеточного цикла. Так, Rad3 и Rad9 – трансдуцирующие киназы, запускающие каскад событий, связанных с арестом клеточного цикла. Rad1-Rad9-Hus1 комплекс представляет из себя «скользящую застежку», для ассоциации которой с аберрантной ДНК необходим Rad17 (Jachymczyk *et al.*, 1981; Lambert *et al.*, 2003).

ГР имеет, по-видимому, множественную роль в репарационном процессе МЦС. Одна из наиболее важных – это участие в репарации двуцепочечных разрывов (ДЦР), возникающих при залечивании МЦС (McHugh *et al.*, 2001). Другая роль – это формирование субстрата для второго раунда NER, в результате которого происходит полное высвобождение аддукта (Van Houten *et al.*, 1986; Cheng *et al.*, 1988; Sladek *et al.*, 1989).

Для *Saccharomyces cerevisiae* описана Rad51 эпистатическая группа белков, отвечающая за репаративную ГР. Rad51 представляет собой белок рекомбинации, формирующий филамент с одноцепочечным участком конца разорванной молекулы ДНК, процессированного после возникновения ДЦР. Rad54 – фактор, отвечающий за поиск гомологии по геному, а Rad52 – за инвазию цепи и формирование гетеродуплекса.

Показано, что гетеродимер Rad10-Rad1, кроме того что участвует в NER, вовлечен также

в ГР по механизму спаривания одноцепочечного участка, сопряженного с синтезом ДНК (SSA) (Jachymczyk *et al.*, 1981; Miller *et al.*, 1982; McHugh *et al.*, 1999; Simon *et al.*, 2000). В процессе SSA фактор принимает участие как специфичная нуклеаза при процессинге интермедиатов, формирующихся при ГР. Одноцепочечный 3'-конец процессированного ДЦР объединяется с найденными 60–90 нуклеотидами общей гомологии, и свисающий участок цепи обрезаются Rad10-Rad1 гетеродимером (Fishman-Lobell *et al.*, 1992; Fishman-Lobell, Haber, 1992; Harrington, Lieber, 1994; Ivanov, Haber, 1995).

При репарации МЦС для дрожжей описан механизм, протекающий без участия ГР. Фактор Pso1/Rev3, отвечающий за этот путь, является TLS полимеразой дзета (Pol ζ). Мутанты по Pso1/Rev3 не жизнеспособны при индукции в клетке МЦС. Фермент важен при процессинге интермедиатов МЦС в неделящихся клетках. Pol ζ (Pso1/Rev3), по-видимому, осуществляет TLS до стадии разъединения МЦС (Henriques, Moustacchi, 1980; Morrison *et al.*, 1989; Nelson *et al.*, 1996; McHugh *et al.*, 2000) (рис. 5).

В дополнение к перечисленным системам, контролирующим репарацию МЦС, существует еще один независимый фактор Pso2/Snm1, мутанты по которому также уникально чувствительны к действию кросслинквирующих цитостатиков (Henriques, Moustacchi, 1980; Ruhlmann *et al.*, 1981a, b). Предполагается, что Pso2 в комплексе с Pias1 регулирует иммобилизацию и модификацию в сайте повреждения (фокусах репарации) других репаративных белков и действует как структурный белок, формирующий подходящий субстрат для ГР (Ishiai *et al.*, 2004).

2.2.2. Репарация МЦС у дрожжей на разных стадиях клеточного цикла

Пути репарации и комплекс механизмов, принимающие участие в репарации МЦС у дрожжей, связаны со стадией клеточного цикла. В работе, выполненной в группе McHugh (Barber *et al.*, 2005), рассматривается участие систем, отвечающих за репарацию МЦС, возникающих на различных стадиях клеточного цикла – G1, G2, S.

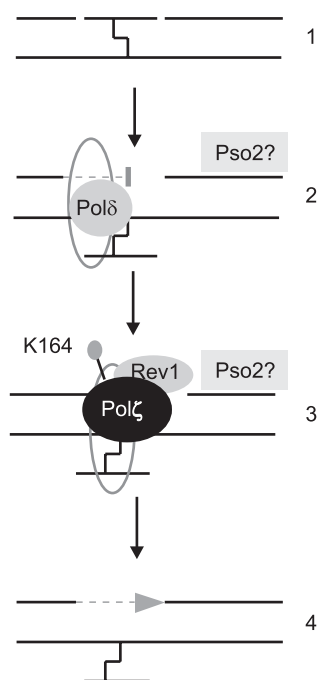


Рис. 5. Репарация МЦС путем TLS.

1 – вырезание олигонуклеотида вокруг МЦС белками NER системы; 2 – попытка нормальной репарации бреши при помощи полимеразы дельта (Polδ), столкновение которой с МЦС вызывает сигнал, эквивалентный тому, который образуется при остановке репликативной вилки; 3 – моноубиквитинирование PCNA и быстрая замена Polδ на Polζ (Pso1/Rev3), возможно, в кооперации с Rev1; 4 – заполнение бреши путем TLS (Sarkar *et al.*, 2006).

В G1-фазе (рис. 6) на первом этапе происходит формирование надрезов с обеих сторон от МЦС при помощи белков NER-системы. После эксцизии обнаруживается активность фактора Pso2 (Sarkar *et al.*, 2006). Мутанты по Rad52 не чувствительны к действию цитостатика в G1-фазе, что свидетельствует о том, что аппарат ГР не играет роли в репарации МЦС в G1-фазе клеточного цикла *S. cerevisiae*. Для репарации в стационарной фазе необходима активность Polζ, что предполагает участие TLS для завершения репаративного процесса (McHugh *et al.*, 2000). В целом в G1-фазе репарация происходит с участием NER и TLS. В результате активности NER-системы формируются надрезы с обеих сторон от МЦС и происходит «выворачивание» олигонуклеотида размером 24–32 нуклеотида, ковалентно связанного через МЦС с противоположной цепью молекулы ДНК (McHugh *et al.*, 1999). Формируется одноцепочечная брешь. Polδ осуществляет попытку заполнения

одноцепочечной бреши, но останавливается в месте оставшегося аддукта, соединенного с олигонуклеотидом (рис. 5). Это приводит к убиквитинированию белка репликации PCNA и привлекает в сайт репарации Polζ (Pso1/Rev3). Полимераза TLS заполняет брешь, проходя насквозь нуклеотид с оставшимся аддуктом. Моноубиквитинирование PCNA служит в качестве молекулярного сигнала, необходимого для запуска процесса, замещающего репликативную Polδ на TLS полимеразу Polζ (Stelter, Ulrich, 2003; Kannouche *et al.*, 2004; Watanabe *et al.*, 2004). На конечном этапе осуществляется второй раунд NER, характеризующийся вырезанием аддукта, синтезом по комплементарной цепи ДНК и последующим лигированием.

Для G2-фазы механизм ГР также не является главным путем репарации МЦС. NER, Pso2 и TLS – основные механизмы репарации на этой стадии клеточного цикла. Тем не менее Rad52 мутанты чувствительны к действию цитостатика, что предполагает некоторый вклад в репаративный процесс механизма ГР. По-видимому, в G2-фазе могут работать оба механизма, NER и



Рис. 6. Репарация МЦС в G1-фазе у *S. cerevisiae*.

1 – появление МЦС; 2 – формирование надрезов с обеих сторон от МЦС при участии белков NER-системы и эпистатического ей Pso2 фактора; 3 – «выворачивание» олигонуклеотида; 4 – заполнение бреши путем TLS; 5 – второй раунд NER, вырезание аддукта; 6 – синтез по комплементарной цепи ДНК и лигирование (Barber *et al.*, 2005).

ГР, причем механизм NER совместно с активностью Pso2 более предпочтителен для клетки (рис. 7). При выборе основного пути репарации МЦС в G2-фазе после действия NER так же, как и в G1-фазе активируется TLS (Barber *et al.*, 2005). Предположительно, факторы Rad6 и Rad18 обладают TLS полимеразной активностью. Клетки, несущие мутации по этим генам, чувствительны к действию кросслинкующих цитостатиков на протяжении всего клеточного цикла, что предполагает их ответственность за репарацию МЦС в пострепликационной стадии клеточного цикла.

При использовании клеткой минорного пути репарации после вырезания олигонуклеотида осуществляется поиск гомологичного геномного участка белками Rad52 семейства, инвазия 3'-конца и синтез по гомологичной матрице. На последней стадии в обоих случаях происходит

второй раунд NER, характеризующийся вырезанием аддукта и последующим репаративным синтезом и лигированием цепи ДНК.

Ситуация в S-фазе более сложная. МЦС блокирует движение репликативной вилки. При этом активируется NER – первоочередной механизм, делающий повреждение доступным для следующих этапов репарации. Белки NER-системы формируют надрезы с двух сторон от МЦС. Предполагается, что в результате этого процесса пассивно образуется ДЦР. Для S-фазы показано снижение активности Pso2, связанное, по-видимому, с существованием другого конкурентного процесса, ассоциированного с активностью механизма репарации нуклеотидных замен (mismatch репарация) и активностью экзонуклеазы 1 (Barber *et al.*, 2005). Вырезанный NER участок нити ДНК восстанавливается либо путем TLS, либо в результате неконсервативной

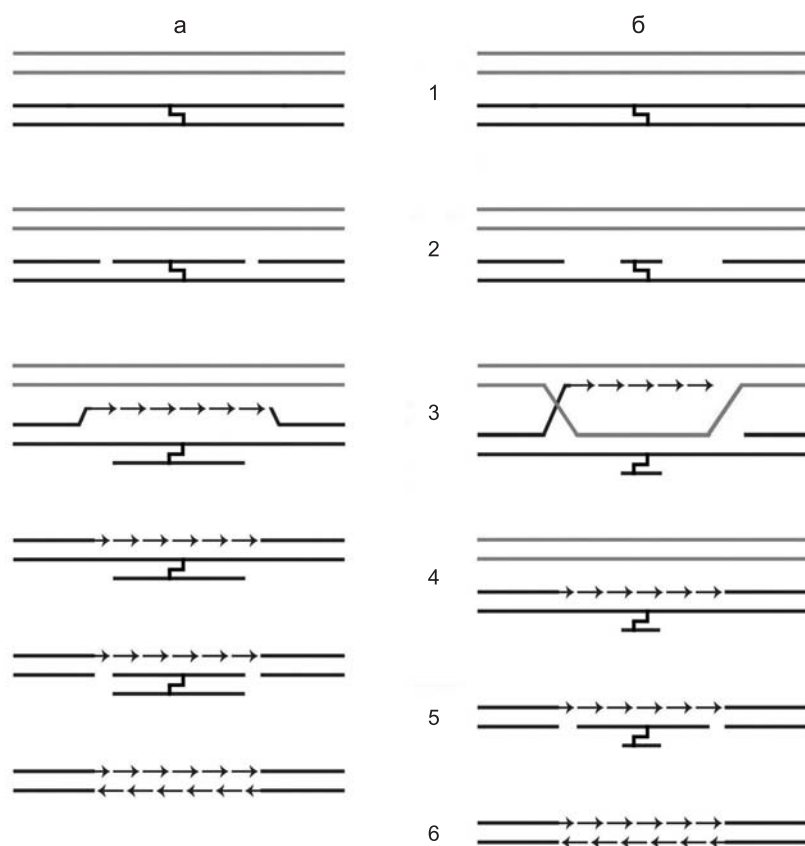


Рис. 7. Репарация МЦС в G2-фазе у *S. cerevisiae*. а – основной путь репарации МЦС с участием механизма TLS. Все стадии сходны с таковыми в G1-фазе. б – минорный путь репарации МЦС.

1 – появление МЦС; 2 – вырезание олигонуклеотида с участием NER белков; 3, 4 – поиск гомологичного участка белками Rad52 семейства, инвазия 3'-конца и синтез ДНК по гомологичной матрице; 5 – второй раунд NER, вырезание аддукта; 6 – репаративный синтез цепи ДНК (Barber *et al.*, 2005).

ГР с использованием механизма SSA. Репарация ДЦР идет с участием белков ГР, при этом формируется свободный 3'-конец, который находит гомологию, инвазирует и образует гетеродуплекс с гомологичным участком ДНК (рис. 8).

Как следует из проведенного генетического и молекулярного анализа, ГР не является основным путем репаративного процесса и важна в случае дрожжей только на стадии деления клетки. На стадиях G1 и G2 клеточного цикла основными механизмами репарации являются NER, система Pso2/Snm1 и TLS. При репарации МЦС у дрожжей все факторы NER-системы необходимы для репаративного процесса.

2.2.3. Увеличение и уменьшение количества tandemных повторов, индуцированные репарацией ДЦР (на модели дрожжей)

ДЦР появляются в клетке как естественным путем, связанным с различными молекулярными процессами, так и при воздействии внешних факторов, таких, как кросслинквирующие цитостатики, γ -радиация, некоторые антибиотики. Репарация ДЦР может быть причиной увеличения или уменьшения количества tandemных повторов в геноме (Paques *et al.*, 1998). Как известно, нестабильность повторов у человека является причиной многих генетических заболеваний, например, увеличение количества минисаттелитов приводит к болезни Хантингтона, изменение количества микросаттелитов также является губительным для клетки. Как следует из результатов, полученных на дрожжах, эти процессы также могут быть следствием неправильной репарации ДЦР.

ДЦР у дрожжей в S-фазе главным образом репарируются путем ГР. Так, если отсутствует гомологичная матричная цепь, то эффективность репарации ДЦР падает до 0,3 %. Однако если в гомологичную матричную цепь внести ряд tandemных повторов, то в процессе ГР можно обнаружить целый ряд новосинтезированных цепей ДНК, содержащих разное количество данных повторов. В большинстве случаев такая реорганизация ДНК наблюдается только у вновь синтезированной молекулы ДНК, в которой находилось повреждение. В этом случае процессированный 3'-конец ин-

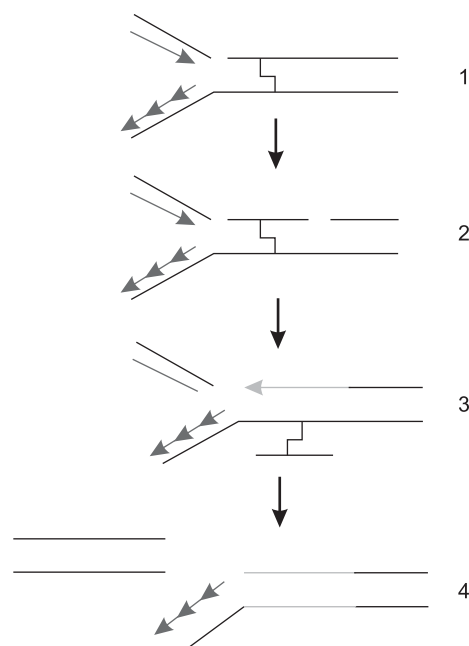


Рис. 8. Репарация МЦС в S-фазе у *S. cerevisiae*.

1, 2 – движущая репликативная вилка наталкивается на МЦС, вследствие чего происходит ее остановка и блокирование; после обнаружения клеткой повреждения активируются белки NER-системы, которые формируют надрезы с двух сторон от МЦС, в результате чего образуется ДЦР; 3 – восстановление участка ДНК либо путем TLS, либо синтезом по гомологичной матрице; 4 – второй раунд NER. Репарация ДЦР идет с участием белков ГР (Barber *et al.*, 2005).

вазирует в гомологичную нить ДНК, и с него, как с затравки, начинается синтез ДНК, после чего он отсоединяется от матричной молекулы, оставляя ее в интактном виде (рис. 9, а 1–3). Изменение в структуре ДНК наблюдается и в матричной цепи ДНК, что может быть объяснено конверсией или кроссинговером. В этом случае второй процессированный конец ДЦР спаривается с отодвинутой первым 3'-концом цепью матричной ДНК, с него также начинается синтез, образуется структура Холлидея, и вновь синтезируемые цепи не уходят от матричной цепи (рис. 9, а 4–6). Данная модель также может объяснить увеличение или уменьшение количества tandemных повторов в геноме (рис. 9, б). Так, если вновь синтезированная цепь ДНК отсоединилась от матричной молекулы и не находит внешний гомологичный участок, необходимый для спаривания, то она может заново инвазировать в то же место гомологичной цепи

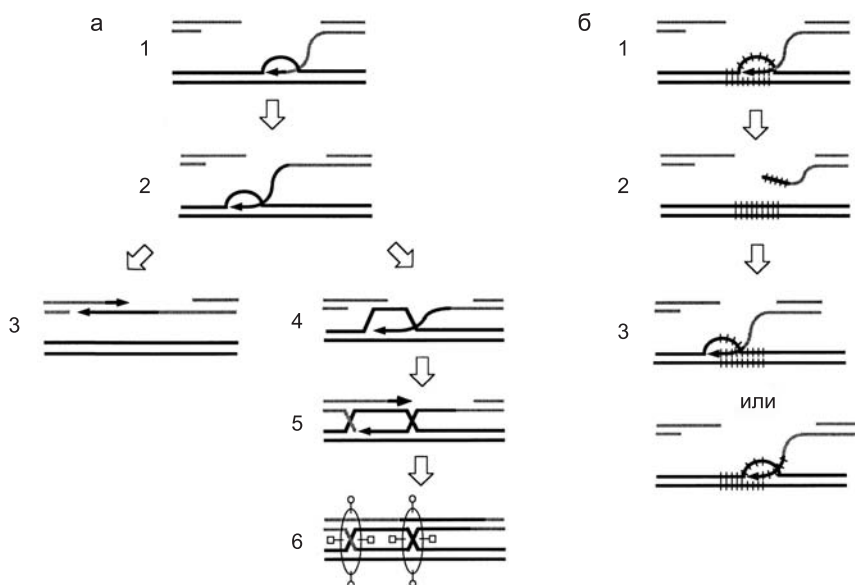


Рис. 9. Репарация ДЦР у дрожжей (а) и модель увеличения или уменьшения количества tandemных повторов в геноме (б).

а: 1 – инвазия процессированного 3'-конца ДЦР в гомологичный участок цепи ДНК; 2 – начало синтеза ДНК с матрицы гомологичной цепи ДНК; 3 – отсоединение новосинтезированной цепи ДНК, матричная гомологичная цепь ДНК остается в исходном виде; 4 – образование структуры Холлидея; 5 – использование второго 3'-конца ДЦР в качестве затравки для синтеза ДНК; 6 – разрезание структуры Холлидея эндонуклеазами, при этом может произойти либо генная конверсия, либо кроссинговер, оба эти процесса ведут к изменениям в структуре как репарируемой, так и матричной нитей ДНК.
б: 1, 2 – инвазия и синтез ДНК с процессированного 3'-конца ДЦР; 3 – повторная инвазия (Paques *et al.*, 1998).

ДНК. Последующий синтез того же фрагмента будет служить причиной амплификации данного участка в геноме.

Уменьшение копийности tandemных повторов можно объяснить следующей схемой (рис. 10). Оба процессированных 3'-конца молекулы ДНК, в которой произошел ДЦР, инвазируют в гомологичную матричную молекулу и служат

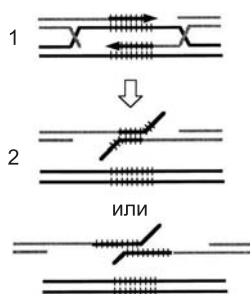


Рис. 10. Уменьшение копийности tandemных повторов.

1 – синтез tandemных повторов с обоих 3'-концов ДЦР по матрице гомологичной цепи ДНК; 2 – возможные пути отжига концов ДЦР после отсоединения от гомологичной цепи ДНК (Paques *et al.*, 1998).

затравками для синтеза ДНК. Если при этом происходит синтез нескольких расположенных подряд повторов, вновь синтезированные цепи могут отжигаться друг с другом не только концевыми участками повторов, но и повторами, находящимися в середине синтезированной цепи ДНК (рис. 10). При дальнейшей репарации выступающие концы, содержащие какое-то количество повторов, отрезаются специфичной эндонуклеазой.

2.3. Механизм репарации МЦС у высших эукариот

Репарация МЦС у высших эукариот имеет общие черты с таковой, описанной для дрожжей. Одним из наиболее важных отличий репарации МЦС у млекопитающих является тот факт, что факторы NER высших эукариот не являются абсолютно необходимыми для репарации МЦС (Чмуж и др., 2006). При этом у дрожжей большая часть, если не все белки репарации системы NER, вовлечены в репаративный процесс, как это продемонстрировано

с использованием соответствующих мутантов (Jachymczyk *et al.*, 1981; Lambert *et al.*, 2003). У млекопитающих только мутанты по генам ERCC1 и XPF экстремально чувствительны к появлению МЦС. Мутанты по другим генам NER, таким, как XPA/Rad14, RPA, TFIIH, XPG/Rad2, XPC-HR23B/Rad4-Rad23, проявляют умеренную чувствительность к цитостатикам, индуцирующим МЦС (Guzder *et al.*, 1995; Mu *et al.*, 1995; De Silva *et al.*, 2000; Dronkert, Kanaar, 2001; Zhang *et al.*, 2007).

Гетеродимер ERCC1-XPF, являющийся структурно-специфичной эндонуклеазой (De Laat *et al.*, 1998), играет центральную роль в репарации МЦС. XPG и ERCC1-XPF ограничивают повреждение надрезами нити ДНК по обе стороны от МЦС. При этом XPG делает надрез первым с 3'-конца от повреждения (O'Donovan *et al.*, 1994). После этого гетеродимер ERCC1-XPF вырезает олигонуклеотид размером 28 нуклеотидов в 5'-области от МЦС (Mu *et al.*, 1996; Smeaton *et al.*, 2008). Надрезы эндонуклеазами происходят, по-видимому, на расправленном участке хроматина, который формируется с участием геликазы, находящейся в комплексе ферментов, обслуживающих Ori репликации (Park *et al.*, 1995; Evans *et al.*, 1997). Эндонуклеазная активность комплекса ERCC1-XPF сопряжена с физическим взаимодействием с XPA – полипептидом, относящимся к белкам ядерного матрикса. XPA в свою очередь взаимодействует с ДНК и набором репаративных факторов, включая RPA (репликативный белок А) и TFIIH (Park, Sancar, 1994; Li *et al.*, 1995; Saijo *et al.*, 1996). Показано, что XPA опознает специфические интермедиаты NER процесса и физически ассоциирует с ними (Jones, Wood, 1993; Camenisch *et al.*, 2006; Krasikova *et al.*, 2008; Maltseva *et al.*, 2008). При этом фактор XPA направляет в точку сформированного комплекса ERCC1-XPF гетеродимер (Volker *et al.*, 2001) и физически связывается с районом 96–214 аминокислотных остатков ERCC1 субъединицы своей короткой областью 67–80 аминокислотных остатков. Именно это взаимодействие является абсолютно необходимым для NER функции комплекса ERCC1-XPF (Tsodikov *et al.*, 2007).

ERCC1-XPF не принимает участия в формировании ДЦР при репарации МЦС. При

этом появление ДЦР связано с прохождением клеткой S-фазы. В одних работах показано, что гетеродимер ERCC1-XPF в обязательном порядке необходим для конечной репарации ДЦР. Причем восстановление целостности репарируемого участка ДНК происходит с участием механизма ГР. Гетеродимер ERCC1-XPF вовлечен в репарацию ДЦР посредством как механизма неконсервативной рекомбинации – SSA, так и полноценной ГР с образованием кроссоверных продуктов (Sargent *et al.*, 1997; Pâques, Haber, 1999; Adair *et al.*, 2000; Langston, Symington, 2004; Niedernhofer *et al.*, 2004). Факты, приведенные в других работах, заставляют предположить, что активность гетеродимера ERCC1-XPF несущественна для репарации ДЦР (De Silva *et al.*, 2000).

Описано еще одно важнейшее свойство комплекса ERCC1-XPF – это его 3'→5' экзонуклеазная активность и способность проходить сшивки. Оказалось, что гетеродимер может гидролизовать линейную ковалентно сшитую с другой цепью цепь ДНК, проходя МЦС насквозь. Этой активностью МЦС конвертируется в одноцепочечную ДНК с динуклеотид аддуктом. Размер гидролизуемого участка согласно экспериментам, выполненным в работе (Mu *et al.*, 2000), составляет ~150 п.н. Как следует заметить, для *E. coli* размер одноцепочечного участка составляет ~700 п.н. Reardon с соавт. (1991), анализируя процесс репарации МЦС, впервые показали, что удаление МЦС сопряжено с высоким уровнем синтеза ДНК. По-видимому, репарация оставшегося одноцепочечного интермедиата связана с активностью TLS полимераз, что и определяет высокий уровень синтеза ДНК, обнаруживаемый при репарации МЦС (Reardon *et al.*, 1991).

В промежутке между процессами NER и ГР для эукариот определены еще два фактора, нокауты по генам которых также приводят к сверхчувствительности клеток к МЦС. Это Artemis/Snm1 и Mus81. Pso2/Snm1 абсолютно необходим как фактор репарации МЦС у дрожжей. Его аналог (паралог) у человека Artemis/Snm1 определен как ген, дефект которого приводит к иммунодефициту вследствие чувствительности иммунокомпетентных клеток к радиации и невозможности репарации ДЦР по механизму негомологичного объединения концов (NHEJ).

Artemis/Snm1 является специфичной 5'→3' экзонуклеазой, субстратом для которой служит одноцепочечная ДНК. При ассоциации с каталитической субъединицей АТМ фактор Artemis/Snm1 фосфорилируется и проявляет гидролитическую активность в отношении свисающих 5'- и 3'-концов и экзонуклеазную активность, расщепляющую петли ДНК. Для репарации МЦС высших эукариот этот фактор существенного значения не имеет, и его функция полностью отличается от функции его паралога у дрожжей (Ishiai *et al.*, 2004).

Механизм появления ДЦР при репарации МЦС до последнего времени оставался загадочным. Было достоверно известно, что это связано с процессом репликации. Недавно было установлено, что Mus81-Eme1 комплекс, представляющий собой структурно-специфичную экзонуклеазу, отвечает за формирование ДЦР при репарации МЦС (Hanada *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2007). Экзонуклеаза Mus81 делает надрез одной нити ДНК в разветвленной структуре ДНК, имеющей три двуцепочечных ответвления, которая как интермедиат появляется при остановке репликативной вилки. При этом показано, что при остановке репликативной вилки, вызванной одноцепочечными разрывами, сформированными вследствие воздействия химических или медицинских препаратов, активности Mus81 не требуется. Один двуцепочечный конец, возникший в результате действия Mus81-Eme1 комплекса, является подходящим субстратом для ГР. Генерированные экзонуклеазой ДЦР процессируются и участвуют в ГР с привлечением Rad54, при этом Mus81 и Rad54 физически контактируют друг с другом (Hanada *et al.*, 2006) (рис. 11).

Существуют несколько точек зрения на последовательность событий при репарации МЦС у высших эукариот и набор факторов, участвующих в этом процессе. Для всех экспериментально подкрепленных схем репарации МЦС предполагаются следующие участники процесса.

В S-фазе происходит встреча репликативной вилки с повреждением. Вследствие экзонуклеазной активности Mus81 возникают ДЦР. Гетеродимер ERCC1-XPF проявляет эксцизионную или экзонуклеазную активность совместно с RPA. Происходит репаративная неконсервативная ГР, за которой следует второй раунд

эксцизии гетеродимером ERCC1-XPF и полное удаление диаддукта. Двуцепочечный конец процессируется репарирующими факторами. Далее следует консервативная ГР и восстановление репликативной вилки.

Последовательность событий в некоторых случаях дискуссионна. Так, показано, что на начальном этапе репаративного процесса NER и формирование ДЦР могут следовать друг за другом в обратном порядке. В таком случае первоначально индуцируется эксцизия повреждения и освобождение МЦС. Далее при движении репликативная вилка обрывается на участке одноцепочечного интермедиата и таким образом формируется ДЦР (Rothfuss, Grompe, 2004).

Для G1- и G2-фаз процесс репарации может начинаться с активации эксцизионной системы, однако завершение процесса, как указывается в большинстве работ, требует продвижения клетки в S-фазу, формирования ДЦР и их репарации после полного удаления аддукта.

Показано, что МЦС, возникающие в активно транскрибирующихся районах хромосом, репарируются предпочтительнее по сравнению с транскрипционно молчащими локусами (Heyer, 2004). Предполагается, что блокирование транскрипции определяет токсичность МЦС в G1- и G2-фазах клеточного цикла (Hanada *et al.*, 2006).

Экспериментальная неоднозначность представлений о последовательности событий при репарации МЦС не позволяет в настоящем обзоре обобщить до общепризнанной схемы механизм репарации такого повреждения. Мы полагаем, что анализ полученных фактов в контексте, обозначенном авторами, будет наиболее правильным подходом в оценке молекулярных событий, имеющих место при репарации МЦС у высших эукариот.

2.4. Некоторые экспериментально обоснованные схемы репарации МЦС у млекопитающих, описанные в мировой литературе за последние пять лет

В работе группы Kanaar (Hanada *et al.*, 2006) было показано, что Mus81-Eme1 комплекс вовлечен в формирование ДЦР при репарации МЦС в S-фазе клеточного цикла. Показано, что ДЦР возникают после индукции МЦС в ходе

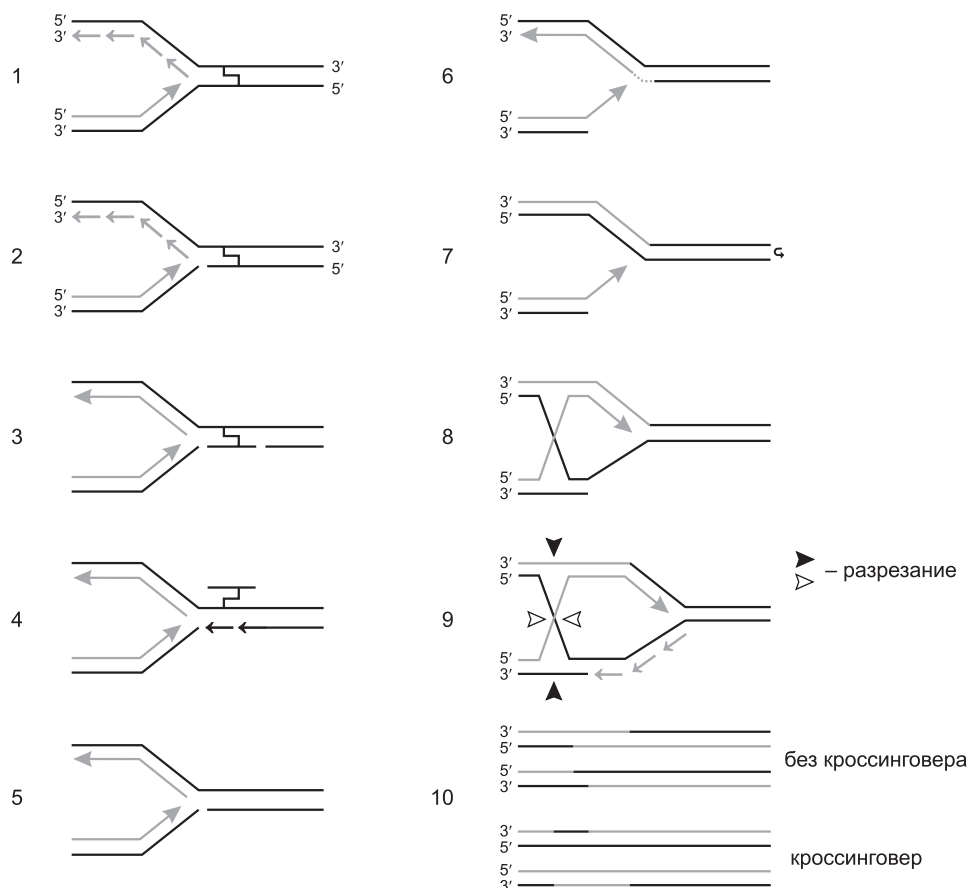


Рис. 11. Репарация МЦС в S-фазе у высших эукариот.

1 – репликационная вилка останавливается при столкновении с МЦС; 2 – Mus81-Eme1 фактор осуществляет надрез одной нити ДНК, что приводит к возникновению ДЦП; 3 – ERCC1-XPF эндонуклеаза осуществляет надрезы в расплавленной цепи ДНК с двух сторон от МЦС; 4 – происходят «выворачивание» аддукта (олигомера, прикрепленного при помощи МЦС к одной из цепей ДНК) и начало ресинтеза ДНК TLS полимеразой; 5 – второй раунд эксцизии и репарации с использованием матричного синтеза; 6 – генерированный двухцепочечный конец процессируется специфичной экзонуклеазой, в результате чего образуется свободный 3'-конец; 7 – лигирование ресинтезированной ДНК; 8 – поиск гомологии фактором Rad54 и инвазия свободного 3'-конца при помощи Rad52; 9 – восстановление репликационной вилки со сменой лидирующей и отстающей цепей; 10 – продукты репликации (Helleday, 2003).

репликации без участия ERCC1-XPF комплекса (Niedernhofer *et al.*, 2004).

Этот факт определяет некоторые особенности репаративного процесса МЦС. В целом схема репарации выглядит следующим образом (рис. 12). МЦС препятствует плавлению нити ДНК, требуемой для репликации, и это индуцирует остановку репликационной вилки. Точная позиция остановки репликационного комплекса не известна, репликационные геликазы могут остановиться в нескольких нуклеотидах от сшитой нуклеотидной пары. Появление одноцепочечного участка в синтезируемой цепи ДНК связано с раскоординацией в синтезе лидирующей и опаздывающей цепей.

В области репарации МЦС формируются интермедиатные разветвленные структуры двуцепочечной ДНК, содержащие одноцепочечный участок. Эти структуры являются субстратом для разрезания Mus81 нуклеазой, которая, как показано в анализируемой работе, отвечает за формирование ДЦП при репарации МЦС. Установлено, что для ERCC1-XPF субстратом для разрезания служит трехразветвленная структура ДНК, две ветви которой представляют собой одноцепочечные участки, в то время как для активности Mus81 требуется трехразветвленная структура ДНК, все ветви которой представляют собой дуплексы (De Silva *et al.*, 2002). Mus81 разрезает указанный интермедиат,

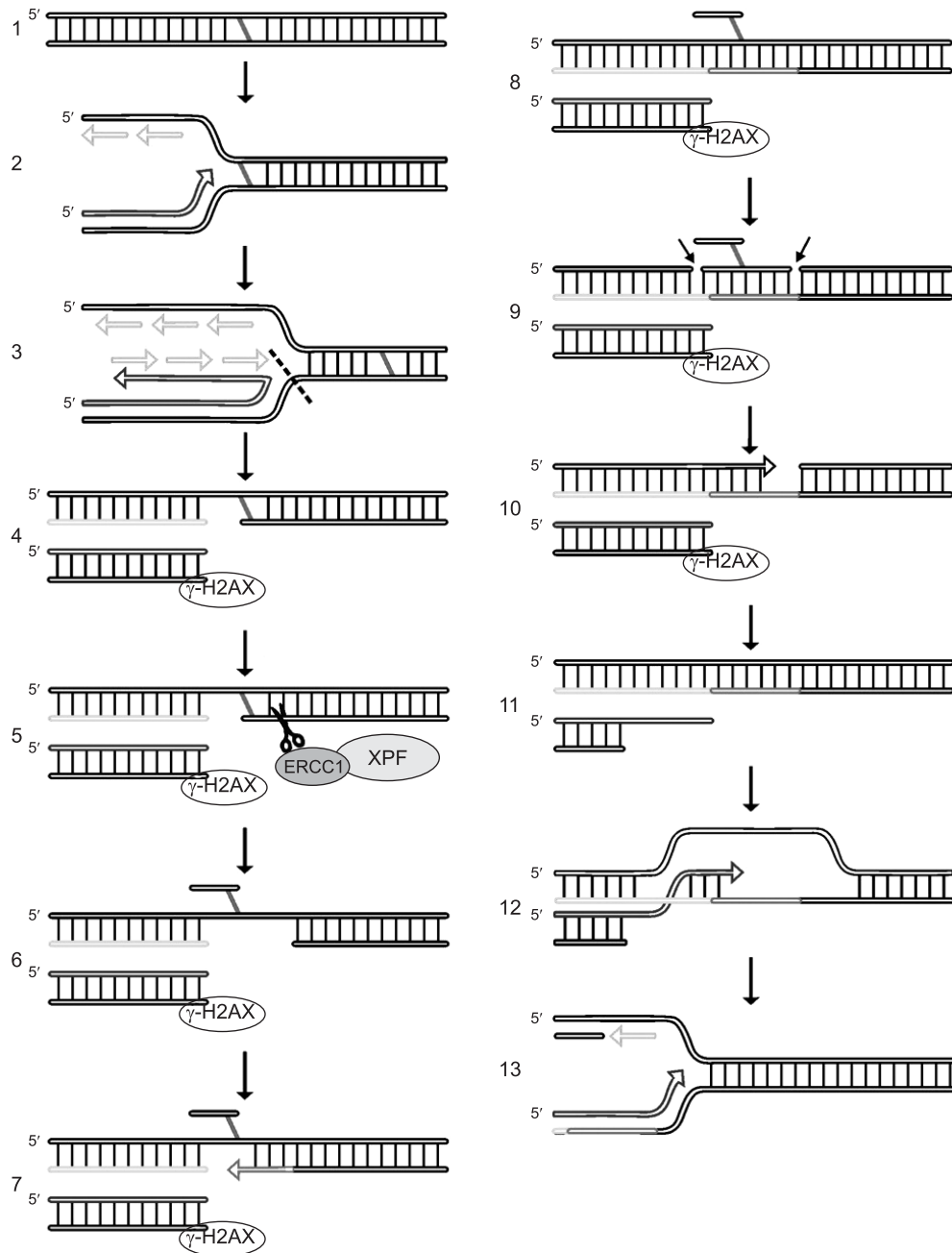


Рис. 12. Схема репарации МЦС по: Niedernhofer с соавт. (2004).

1, 2 – возникновение МЦС, остановка репликативной вилки при встрече с повреждением; 3 – гидролиз Mus81 и формирование ДЦР; 4 – фосфорилирование гистона H2AX на 3'-конце ДЦР нити ДНК; 5, 6 – надрезание нити ДНК с 5'-стороны от МЦС ERCC1-XPF комплексом и «выворачивание» олигонуклеотида, присоединенного через МЦС; 7, 8 – заполнение бреши TLS полимеразой Pol ζ по матрице комплементарной цепи ДНК; 9, 10 – второй этап эксцизии ERCC1-XPF фактором, окончательное вырезание аддукта и второй этап ресинтеза ДНК; 11 – процессирование 3'-конца ДЦР; 12 – инвазия активированного конца в гомологичный участок ДНК; 13 – восстановление репликативной вилки.

что приводит к возникновению ДЦР, фосфорилированию гистона H2AX и формированию фокусов репарации. Несмотря на серьезную опасность для клетки, ДЦР необходимы для удаления МЦС и восстановления репликатив-

ной вилки. ДЦР могут служить как «точка выхода» для белков репликации остановившейся репликативной вилки. Также не исключается возможность того, что при формировании ДЦР происходит сбрасывание позитивных витков

суперспирали, ингибирующих присоединение к ДНК множества ДНК-связывающих белков, к которым принадлежат многие репарирующие МЦС факторы. В обоих случаях появление ДЦР создает условия для направления в сайт репарации факторов репарации, включая эксцизионные нуклеазы.

Для репарации сайта МЦС требуется активность гетеродимера ERCC1-XPF, надрезающего ДНК дуплекс по одной цепи в нереплицированном районе от МЦС. «Выворачивание» кросслинкованного аддукта от центра спирали создает эффект одноцепочечного участка, который затем расширяется до нескольких сот пар оснований (De Silva *et al.*, 2000; Akkari *et al.*, 2001; Rothfuss, Grompe, 2004).

Следующим шагом в репарации предполагается TLS через сайт МЦС. Для дрожжей при репарации в стационарных фазах клеточного цикла показан путь с участием TLS полимераз. Предполагается, что у высших эукариот может существовать аналогичный механизм, позволяющий репарировать МЦС (Zhang *et al.*, 2007).

После второго раунда эксцизии ERCC1-XPF и XPG и матричного синтеза репарация МЦС завершается. ГР между дочерними молекулами ДНК может заново восстановить репликативную вилку. Предполагается, что Mus81 нуклеаза формирует 3'-конец разрезанного дуплекса, который инвазирует и спаривается с другой дочерней молекулой таким образом, что образуется праймер для полимеризации. Показано физическое взаимодействие между Mus81 и белком ГР Rad54. Считается, что оба фактора вовлечены в одни и те же связанные с репликацией пути репарации МЦС.

Таким образом, в предложенной схеме (рис. 12) ДЦР формируются до функционирования эксцизионной системы ERCC1-XPF. Предполагается привлечение TLS для полного восстановления интермедиатов репарации МЦС. Восстановление репликативной вилки требует ГР между дочерними молекулами ДНК.

Другая модель предлагается в работе De Silva с соавт. (2000) (рис. 13). В проведенных экспериментах показано, что ДЦР возникают сразу после обработки нитроген мустардом. Максимальное количество ДЦР обнаруживается в S-фазе клеточного цикла, когда отсутствуют какие-либо

признаки репарации МЦС. Этот факт свидетельствует о том, что для активации процессов репарации требуется репликация, и что появление ДЦР предшествует вырезанию аддукта.

Как было установлено в цитируемой работе, репарация ДЦР происходит при обязательном участии комплекса ERCC1-XPF-RPA, который функционирует в таком ансамбле, как 3'→5' экзонуклеаза, проходящая МЦС. Также в репарации задействован механизм ГР и не обнаружены факторы NHEJ механизма. Для репарации МЦС обязательны XRCC2 и XRCC3 – белки высших эукариот, определяющие ГР и относящиеся к Rad51 эпистатической группе. Замещение цепей, стимулированное возникновением МЦС, требует как ERCC1-XPF-RPA, так и XRCC2 и XRCC3 факторов для эффективного завершения процесса рекомбинации. При этом установлено, что гетеродимер ERCC1-XPF не требуется для репарации ДЦР.

На основании полученных экспериментальных фактов была предложена следующая модель репарации МЦС (рис. 13). В делящихся клетках репликативная вилка встречается с МЦС, инактивируется и формируется ДЦР. ДЦР индуцирует ГР, которая сопряжена с инвазией, по-видимому, внешней гомологичной цепи, опосредованной функционированием XRCC2 и XRCC3. Это наиболее ранние события, предшествующие ERCC1-XPF эксцизионной активности. Миграция цепи может останавливаться в сайте МЦС, и это требует вырезания аддукта для продолжения миграции цепи, как это описано для *E. coli* (см. рис. 6, аддукт с олигонуклеотидом прикреплен через МЦС только к одной из цепей ДНК, вторая цепь свободна и по ней ведется синтез с комплементарной цепи ДНК). Ранее было отмечено, что гетеродимер ERCC1-XPF в присутствии RPA функционирует как специфичная экзонуклеаза и способен проходить повреждение. Предполагается, что в этот момент времени ERCC1-XPF проходит повреждение за счет своей 3'→5' экзонуклеазной активности. Одноцепочечный участок, сформированный как результат такого гидролиза, заполняется за счет продолжающейся миграции гомологичной цепи, привлеченной в качестве матрицы для синтеза. Оставшаяся половина аддукта последовательно удаляется вторым раундом эксцизии ERCC1-XPF. Последующие события, определя-

ющие восстановление репликативной вилки и возобновление репликации, в данной модели не рассматриваются.

В следующей работе (Rothfuss, Grompe, 2004) были приведены факты того, что атака МЦС гетеродимером ERCC1-XPФ происходит независимо от ДНК репликации и соответственно S-фазы клеточного цикла. При этом ДЦР появляется только тогда, когда клетка входит в стадию синтеза (рис. 14).

Цитируемая работа связана с анализом участия FA/BRCA метаболического пути в репарации МЦС. FA (Fanconi anemia) мутантные клетки в отличие от нормальных проявляют значительную задержку в S-фазе (Akkarı et al., 2000; Kugaoka et al., 2000). BRCA факторы

контролируют ГР при появлении ДЦР ДНК (Krasnoshtein, Buchwald, 1996; Larminat et al., 2002; Bhagwat et al., 2009). При появлении повреждения в молекуле ДНК происходит активация FANCD2 фактора. Активированный (моноубиквитинированный) FANCD2 (FANCD2-L) обеспечивает соединение BRCA2 с RAD51 и посадку комплекса на сайты повреждения ДНК. Комплекс BRCA2-RAD51 в свою очередь осуществляет поиск гомологичных последовательностей на гомологичных хромосомах или в гомологичных регионах сестринских хроматид, что необходимо для процесса ГР.

Показано, что FA/BRCA метаболический путь, требующийся в ходе репарации МЦС, активируется в S-фазе после формирования ДЦР.

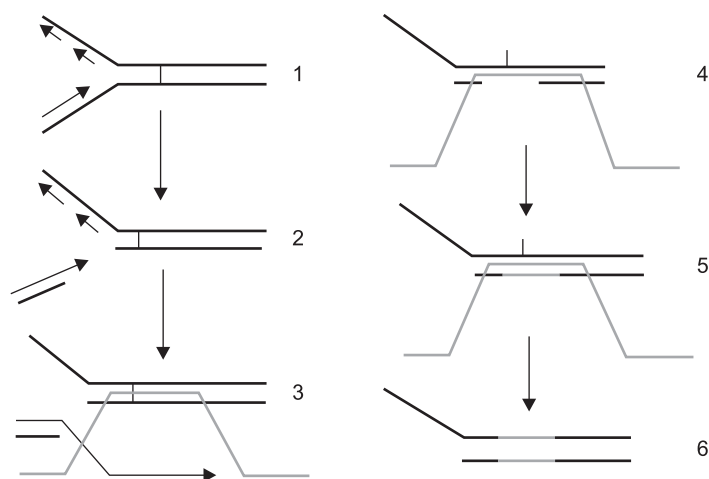
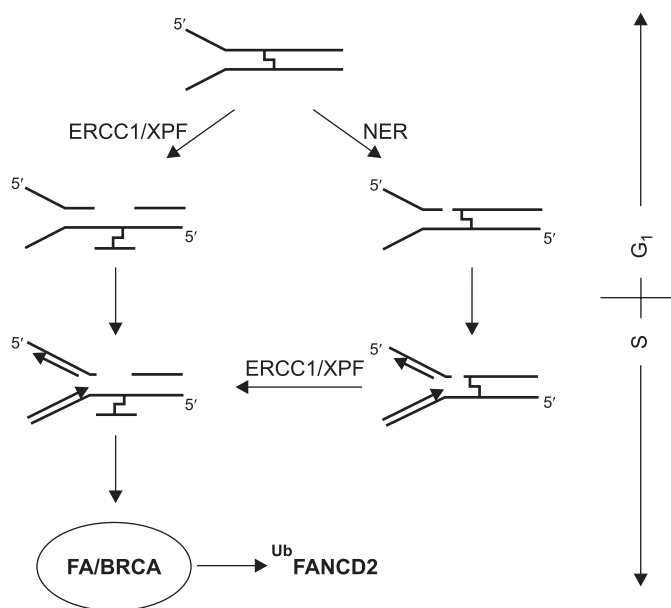


Рис. 13. Схема репарации МЦС по: De Silva с соавт. (2000).

1, 2 – остановка репликативной вилки и формирование ДЦР; 3 – направление гомологичного участка ДНК в сайт репарации за счет функционирования XRCC2 и XRCC3; 4 – «отъякоривание» динуклеотидадукта за счет экзонуклеазной активности ERCC1-XPФ и RPA; 5 – репаративный синтез по гомологичному участку; 6 – полная элиминация аддукта и второй этап репаративного синтеза, в результате чего происходит удаление МЦС.

Рис. 14. Схема репарации МЦС по: Rothfuss, Grompe (2004).

МЦС опознается клеткой мгновенно. Первый путь ответа клетки на повреждение – активация ERCC1-XPФ в комплексе с hMutSβ, что приводит к надрезанию цепи ДНК с двух сторон от МЦС и «отъякориванию» аддукта. При использовании клеткой второго пути белки NER системы осуществляют надрез с 5'-стороны от МЦС, при этом не образуется интермедиата с олигонуклеотидом, прикрепленным к цепи ДНК через МЦС. В S-фазе при столкновении репликативной вилки с повреждением в обоих случаях происходит образование ДЦР. Активируются FA/BRCA белки, что приводит к убиквитинированию FANCD2. Эта система инициирует процесс ГР с последующей репарацией ДЦР.



Авторы приводят модель иницирующих событий при репарации МЦС. Данные, полученные в работе (Rothfuss, Grompe, 2004), свидетельствуют о том, что повреждение, такое, как МЦС, обнаруживается клеткой практически мгновенно. После обнаружения МЦС формируется расплетенный ДНК-интермедиат, позволяющий гетеродимеру ERCC1-XPF и XPG сделать надрезы, обрамляющие сайт сшивки. Это приводит к «отъякориванию» аддукта, соединенного с олигонуклеотидом. Такая структура формируется независимо от репликации в любом месте генома. Обнаруженные факты предполагают, что инцизия МЦС в исследуемой клеточной системе не связана со входом клетки в S-фазу цикла.

Биохимические данные предполагают возможность участия в инцизии МЦС двух различающихся механизмов. В первом случае активность гетеродимера ERCC1-XPF в комбинации с фактором hMutS β производит надрезы в 3'- и 5'-области от МЦС, что приводит к освобождению одного плеча сшивки. Одноцепочечный участок заполняется в ходе TLS. Во втором раунде инцизии происходит двойной надрез в 5'-области от сшивки, приводящий к вырезанию 28 нуклеотидов. МЦС в положении снаружи от центра спирали сохраняется.

В другом варианте уже экзонуклеазная активность ERCC1-XPF в комплексе с RPA может осуществлять репаративные действия также без участия репликации и в конечном счете приводит к «отъякориванию» МЦС в ходе G1-фазы.

Для дальнейшего процесса репарации требуется участие других молекулярных систем. В ходе репликации ДНК возникают ДЦР и запускается клеточный ответ на возникшее повреждение. Сравнение кинетики появления одноцепочечных надрезов и ДЦР свидетельствует о том, что ДЦР появляются позднее. И поскольку ДЦР формируются в S-фазе, то было высказано предположение, что ДЦР формируются пассивно при аресте репликативной вилки в сайте процессированного инцизионными нуклеазами повреждения.

Две группы белков необходимы клетке для нормального процесса репарации МЦС: ERCC1-XPF комплекс и FA семейство белков. FA белки не требуются на начальных стадиях репарации МЦС и важны только после форми-

рования ДЦР. Тем не менее экспериментально не установлено, в какое время происходит активация FA пути репарации – до «отъякоривания» МЦС или после. Данные, полученные в работе Bhagwat с соавт. (2009), показывают, что активность ERCC1-XPF нуклеазы не является необходимым условием для активации FA пути, который заключается в моноубиквитинировании FANCD2. Предполагается, что остановка репликомы при столкновении с повреждением в ДНК является сигналом для активации ATR-киназы, которая и активирует FA путь. Собранные вместе все имеющиеся данные, можно представить следующую модель репарации МЦС в клетке (рис. 15).

FA белки синтезируются в клетке при появлении ДЦР в случае γ -радиации и являются факторами механизма NHEJ. Также FA белки требуются и для репарации МЦС. Известно, что FA белки обнаруживаются в высокой концентрации в тканях, содержащих быстро реплицирующиеся прогениторные клетки (Escarceller *et al.*, 1998; Shimura *et al.*, 2008). Кроме этого, описано, что FANCD2-L обнаруживается в клетке в течение нормальной S-фазы. Эти факты могут свидетельствовать о возникновении ДЦР при нормально протекающей репликации. На существование таких так называемых транзитных ДЦР указывает работа Derbyshire с соавт. (1994), где показано, что для репарации таких повреждений используется механизм, аналогичный NHEJ, позволяющий в течение нескольких минут репарировать дефект, не вызывая при этом активации системы контроля и ареста клеточного цикла. Спонтанное образование ДЦР в клетке может быть связано не только с ошибками, возникающими в процессе репликации, но и с перемещением мобильных генетических элементов в геноме, как это показано у *Drosophila melanogaster* (Чмуж и др., 2007).

В работе Rothfuss, Grompe (2004) рассматривается еще один вариант репарации МЦС. В S-фазе в момент возникновения сшивки остановившаяся репликативная вилка формирует подходящий субстрат для ERCC1-XPF. Это может приводить к возникновению двойного надреза в 5'-области от сшивки, но сама МЦС остается интактной. В ходе дальнейшей прогрессии через S-фазу естественным путем образуется ДЦР. При этом торсионные напряже-

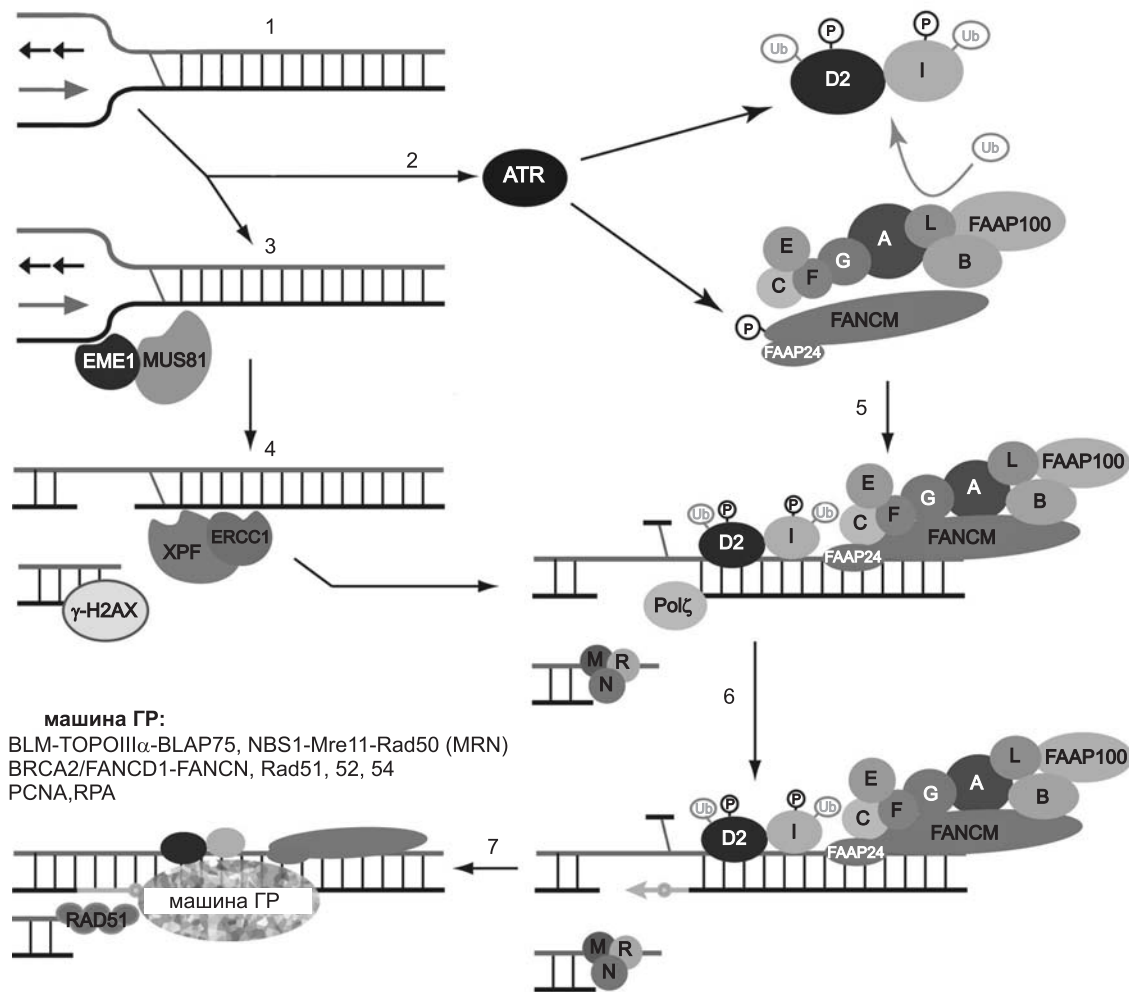


Рис. 15. Схема репарации МЦС по: Bhagwat с соавт. (2009).

1 – остановка репликативной вилки в результате столкновения с повреждением в молекуле ДНК; 2 – активация ATR-киназы, которая фосфорилирует белки FA семейства, что в свою очередь приводит к моноубиквитинированию FANCD2 и активации FA пути репарации; 3, 4 – Mus81-Eme1 и ERCC1-XPF нуклеазы вносят одноцепочечные разрывы с двух сторон от МЦС, что приводит к высвобождению и выворачиванию олигонуклеотида, связанного с ДНК через МЦС, и образованию ДЦР; 5 – посадка активированных белков FA семейства на хроматин и образование фокуса репарации; 6 – одноцепочечная брешь заполняется с использованием TLS; 7 – репарация ДЦР и восстановление репликативной вилки при помощи молекулярной машины ГР.

ния сбрасываются и возникает структура ДНК, которая плавится в 3'-области от МЦС. Далее расплетенный участок ДНК также может быть надрезан гетеродимером ERCC1-XPF, что приведет к «отъякориванию» сшивки. При такой схеме репарации в зависимости от ситуации (одно-/двунаправленная репликативная вилка) в сайте МЦС могут сформироваться два ДЦР. Образование ДЦР запускает метаболический путь, связанный с активностью FA/BRCA, который по механизму, аналогичному NHEJ, репарирует возникший интермедиат. Считается, что такой

путь репарации МЦС ведет к возникновению и накоплению мутаций.

В следующей работе (Evans *et al.*, 2008) говорится о том, что негомологичная рекомбинация – главный путь репарации ДЦР в ДНК соматических клеток млекопитающих. Одним из главных путей негомологичной репарации ДЦР является breakage-fusion-bridge cycle (BFBC) (Derbyshire *et al.*, 1994). В процессе BFBC разорванная хромосома реплицируется во время S-фазы, и концы сестринских хроматид, у которых отсутствует теломерный конец, объединяются друг с дру-

гом. В результате образуется дицентрическая хромосома, которая при расхождении в митозе разрывается, что в свою очередь приводит к потере части генетической информации и к смерти клетки, если данное событие не стабилизируется другими мутационными процессами.

В процессе негомологичного объединения концов участвует NHR-лигаза, активность которой отлична от активности трех известных лигаз в клетках млекопитающих. На модели опухолевых клеток (легочная карцинома человека A549) было показано, что NHR-лигаза не является чувствительной к природе концов ДНК. Она может сшивать тупые концы ДНК, липкие негомологичные концы с выступающей 5'-частью и даже тупой конец с липкими (однако при выступающем 3'-конце лигирование идет намного хуже). При этом концы ДНК модифицируются, прежде чем происходят их объединение и ковалентная сшивка.

Лигирование происходит при активности комплекса, состоящего из NHR-лигазы, 3'→5' экзонуклеазы, HRP-1 и RPA белков. Данный комплекс способен находить гомологичные участки ДНК, обладает 3'→5' экзонуклеазной и лигазной активностями. Таким образом, можно предположить следующую модель негомологичного объединения концов в клетках млекопитающих (рис. 16). Первоначально происходит процессирование концов разорванной ДНК с образованием одноцепочечного 5'-конца;

на следующем этапе за счет активности HRP-1 происходит гомологичное спаривание участвующих в процессе ДНК субстратов, после чего NHR-лигаза осуществляет ковалентное сшивание выступающего 5'-конца с 3'-концом на гомологичной нити ДНК, сохраняя при этом 5'-фосфат.

Другая работа (Akkari *et al.*, 2000) предлагает свое видение проблемы репарации МЦС. В проведенных экспериментах клетки были синхронизированы в каждом из клеточных циклов – G1, S, G2, где они были обработаны кросслинкирующим агентом псораленом, после чего клеткам давали возможность нормального перехода в митоз. В отличие от обработки ионизирующим облучением МЦС, введенные в G2-фазе, не вызывали ареста клеточного цикла, ареста в митозе и вообще хромосомных разрывов. Однако последовательный пассаж через S-фазу клеточного цикла вызывал как арест клеточного цикла, так и разрывы хромосом. Аналогично МЦС, введенные в G1-фазе, не вызывали ареста в G1/S, причем также не обнаруживалась и значимая эксцизионная активность. Авторы считают, что МЦС не определяются клеткой и не репарируются в G1- и G2-фазах клеточного цикла. Предполагается, что после индукции МЦС для активации систем, контролирующей прогрессию клеточного цикла, необходима ДНК репликация. Отсутствие задержки и ареста в G2-фазе предполагает, что в клетке в этой фазе

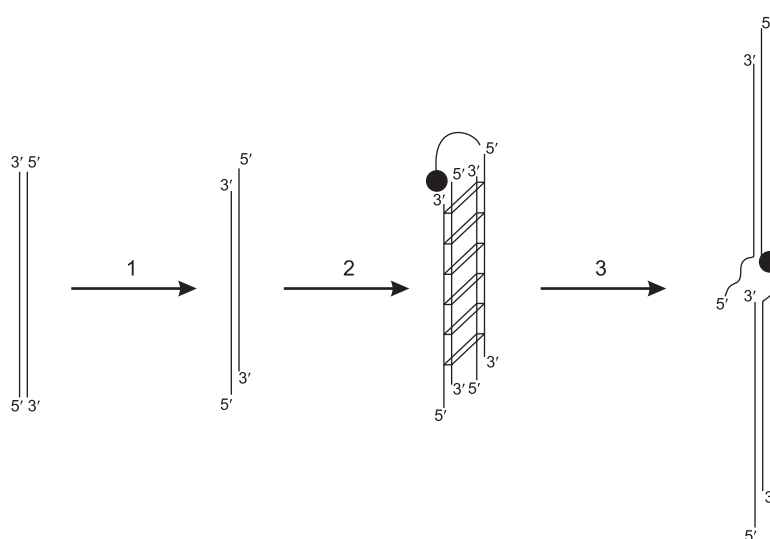


Рис. 16. Модель негомологичного объединения концов при участии NHR-лигазы.

1 – процессирование концов ДНК за счет 3'→5' экзонуклеазной активности комплекса; 2 – гомологичное спаривание нитей ДНК; 3 – лигирование концов с образованием одноцепочечного участка в молекуле ДНК (Derbyshire *et al.*, 1994).

клеточного цикла еще не сформировались ДЦР, которые являются сигналом для активности трансдуцирующих киназ и блокировки молекулярных синтетических процессов (рис. 17). В работе даны количественные оценки, демонстрирующие, что клетка может удалить 2500 МЦС на геном со скоростью 11 МЦС на геном в час.

Возможны два пути репарации МЦС. Удаление МЦС может происходить в результате лигирования двух двуцепочечных концов, как это предполагается для FA клеток (по-видимому, двух двуцепочечных концов, встретившихся в месте МЦС двух репликативных вилок). Этот процесс всегда будет приводить к потере генетической информации и, следовательно, всегда будет мутагеном и токсичен. Возможен второй вариант репарации МЦС, когда для репаративного процесса используется гомологичная последовательность той же самой хромосомы, а не последовательность сестринской хроматиды, как это показано в работе (Richardson *et al.*, 1998).

В заключение необходимо сказать о транзитных ДЦР, формирующихся в результате действия афидиколина. Афидиколин ингибирует

активность полимераз альфа, дельта и эpsilon в эукариотических клетках, но не влияет на синтез белков, РНК и нуклеотидов. Афидиколин образует комплекс с ДНК-полимеразой и действует только на стадии элонгации цепей. Это означает, что антибиотик блокирует прогрессию клеток в S-фазе. При остановке репликативной вилки в случае щадящего воздействия препарата формируются транзитные ДЦР, которые быстро репарируются, и при этом не запускается арест клеточного цикла. В процессе формирования и репарации таких разрывов принимают участие ATR, Mus81 нуклеаза, BLM геликаза и NHEJ-процесс (по-видимому, опосредуемый FA факторами). Если ДЦР индуцированы в клетках, дефектных по указанным факторам репарации, то восстановление повреждения осуществляется с привлечением механизма ГР. Предполагается, что три фермента участвуют в репарации случайных дефектов при репликации таким образом, что не происходит блокирование репликации и не активируется сигнал, индуцирующий арест клеточного цикла (Shimura *et al.*, 2008) (рис. 18).

Множество возможностей в репарации МЦС говорит о сложности данного процесса и его

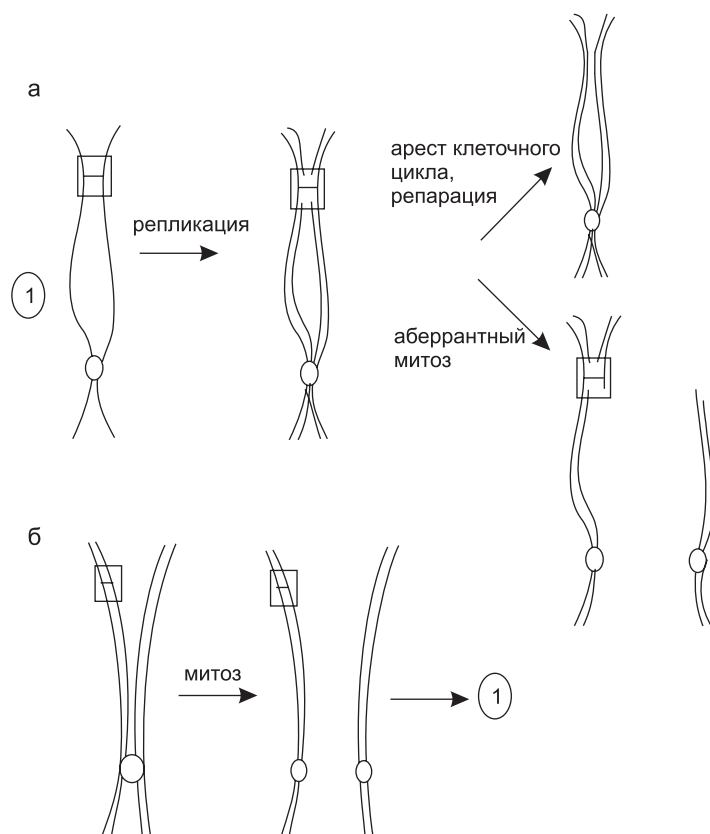


Рис. 17. Модель клеточного ответа на МЦС в зависимости от фазы клеточного цикла.

а – при возникновении МЦС непосредственно перед моментом репликации (конец G1-/начало S-фазы клеточного цикла) происходит остановка репликативной вилки в месте повреждения. Это вызывает арест клеточного цикла, так как клетка не может войти в митоз, пока не произойдет полная репликация хромосом. Невозможность нормального завершения процесса репарации приведет к аберрантному митозу, сопровождаемому разрывом хромосомы и гибелью клетки; б – пострепликативные МЦС, возникающие в G2-фазе, клеткой не опознаются, и клетка благополучно вступает в нормальный митоз. Арест клеточного цикла происходит только, когда дочерняя клетка, в которую попала хромосома с МЦС, войдет в стадию репликации (Akkari *et al.*, 2000).

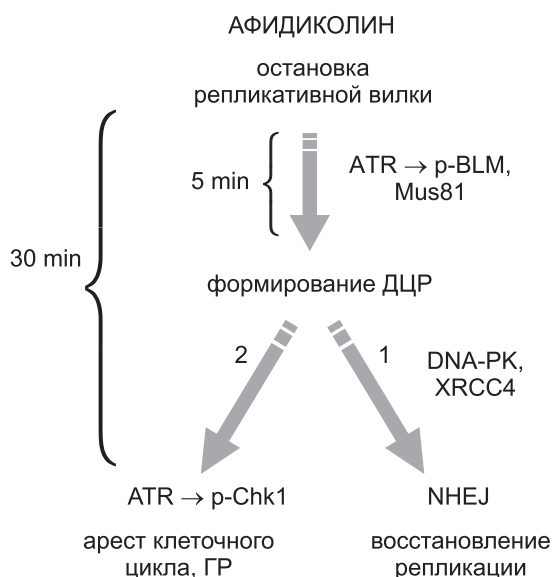


Рис. 18. Схема предполагаемых событий, возникающих в ответ на воздействие ингибитора репликации афидиколина.

Небольшие дозы ингибитора вызывают временную остановку репликативной вилки, в результате чего происходит фосфорилирование BLM геликазы АТР киназой, и совместно с Mus81 индуцируется образование ДЦР. Такое повреждение быстро репарируется негомологичным лигированием концов, что ведет к восстановлению репликации (1). При отсутствии компонентов NHEJ или при высокой дозе ингибитора (2) повреждение не репарируется, репликация не восстанавливается и происходит активация систем, арестующих прогрессию клеточного цикла (Shimura *et al.*, 2008).

зависимости от имманентного выбора клетки, который, по-видимому, непредсказуем. Тем не менее три принципиальных составляющих

процесса репарации МЦС у высших эукариот одинаковы для всех предложенных схем. Это NER, формирование ДЦР и ГР.

Факторы и их свойства

UvrABC – эксцизионный комплекс *E. coli*, делающий надрезы с 5'- и 3'-стороны от МЦС.

UvrD – геликаза *E. coli*.

PolII – полимеразы *E. coli*; при репарации МЦС проявляет 5'→3' экзонуклеазную активность и формирует брешь размером ~ 700 нуклеотидов.

RecA – белок рекомбинации *E. coli*, осуществляющий гомологичное спаривание с подходящей матрицей.

Rad1, Rad2, Rad3, Rad4, Rad9, Rad10, Rad14 – Rad3 эпистатическая группа белков, образующая NER-систему у *S. cerevisiae* и участвующая в репаративном процессе при репарации МЦС.

Rad2 – фактор, разрезающий нить ДНК с 3'-стороны от МЦС.

Rad10–Rad1 – гетеродимер, разрезающий нить ДНК с 5'-стороны от МЦС.

Rad3 и Rad9 – трансдуцирующие киназы, запускающие каскад событий, связанных с арестом клеточного цикла.

Rad1–Rad9–Hus1 – комплекс, представляющий собой «скользящую застежку»; является сенсором возникающих повреждений.

Rad17 – фактор, необходимый для ассоциации комплекса Rad1–Rad9–Hus1 с aberrантной ДНК.

Rad51, Rad52, Rad54 – Rad51 эпистатическая группа белков, отвечающая за репаративную ГР у *S. cerevisiae*.

Rad51 – белок рекомбинации, формирующий филамент с одноцепочечным участком конца разорванной молекулы ДНК, процессированного после возникновения ДЦР.

Rad54 – фактор, отвечающий за поиск гомологии по геному.

Rad52 – фактор, отвечающий за инвазию цепи и формирование гетеродуплекса.

Pso1/Rev3/Polζ – TLS полимеразы, осуществляющая синтез через МЦС.

Polδ – основная полимеразы эукариот.

PCNA (proliferating cell nuclear antigen) – белок, участвующий в репликации эукариот как процессивный фактор для Pol δ .

Pso2/Snm1 – фактор, который в комплексе с PIAS1 регулирует иммобилизацию и модификацию в сайте повреждения (фокусах репарации) других репаративных белков и действует как структурный белок, формирующий подходящий субстрат для ГР.

PIAS1 – короткий убиквитин-подобный модификатор (SUMO) E3 лигазы, первоначально определенный как репрессор транскрипции STAT1.

Rad6 и Rad18 – факторы, предположительно обладающие TLS полимеразной активностью, участвующие в репарации МЦС в G2-фазе клеточного цикла дрожжей.

ERCC1-XPF – гетеродимер, представляющий собой структурно-специфичную эндонуклеазу, которая делает надрез с 5'-конца от МЦС; обладает 3'→5' экзонуклеазной активностью и способностью проходить МЦС.

XPG – эндонуклеаза, которая делает надрез с 3'-конца от МЦС.

XPA – белок, связывающийся с местом повреждения и помогающий сборке репарирующего комплекса; взаимодействует с ERCC1.

RPA (replication protein A) – репликативный белок А; связывается с одноцепочечной ДНК и удерживает ее в таком состоянии.

Artemis/Snm1 – специфичная экзонуклеаза с активностью к одноцепочечной ДНК; проявляет гидролитическую активность в отношении свисающих 5'- и 3'- концев и эндонуклеазную активность, расщепляющую петли ДНК.

ATM (ataxia-telangiectasia mutated) – иерархическая протеинкиназа эукариот; индуцирует каскад событий в ответ на ДЦР, остановку репликативной вилки, общее изменение структуры хроматина высших порядков.

Mus81-Eme1 – комплекс, представляющий собой структурно-специфичную эндонуклеазу; отвечает за формирование ДЦР при репарации МЦС.

H2AX – гистон, который в фосфорилированном состоянии (γ -H2AX) является маркером появления ДЦР.

XRCC2 и XRCC3 (X-ray repair cross complementing) – факторы, которые в комплексе с Rad51 паралогами RAD51C и RAD51B участвуют в формировании фокуса репарации и ГР.

hMutS β – фактор, который образует комплекс с ERCC1-XPF при инцизии МЦС.

FA (Fanconi anemia) – анемия Фанкони, аутосомальное рецессивное генетическое заболевание, связанное с нарушениями в генах, кодирующих белки FANC.

FA/BRCA – метаболический путь в репарации МЦС.

MRN – комплекс белков, продуктов генов человека Rad50/Mre11/Nbs1; участвует в поддержании геномной стабильности, жизнеспособности клетки и активации сигналов контроля клеточного цикла.

BRCA (breast cancer) – семейство белковых факторов, контролирующих ГР ДЦР ДНК.

BRCA1 – фактор, который взаимодействует с MRN комплексом и гистоном γ -H2AX в сайте репарации; обеспечивает «рекрутирование» к сайту репарации других факторов репарации.

BRCA2 – фактор, регулирующий Rad51-рекомбинацию; в комплексе с RAD51 производит поиск гомологии; препятствует кроссинговеру между смещенными сестринскими хроматидами, что предполагает его роль в когезии сестринских хроматид.

FANCD2 – фактор, который в моноубиквитинированном состоянии (FANCD2-L) обеспечивает соединение BRCA2 с RAD51 и посадку комплекса на сайты повреждения ДНК.

ATR (ATM-related protein) – иерархическая протеинкиназа высших эукариот; активируется при нарушениях, связанных с остановкой репликативной вилки.

NHR-лигаза (nonhomologous repair-лигаза) – лигаза в клетках млекопитающих, не обладающая спецификой к структуре двухцепочечных концов; объединяет тупые концы ДНК, липкие негомолгичные концы с выступающей 5'-частью, тупой конец с липким (при выступающем 3'-конце лигирование идет намного хуже).

НРР-1 (homologous pairing protein) – фактор, опосредующий гомологичное спаривание ДНК субстратов.

Афидиколин – антибиотик, ингибирующий активность полимераз альфа, дельта и эpsilon в эукариотических клетках.

ВЛМ геликазы (Bloom's syndrome) – геликаза семейства RecQ, которая аккумулируется в сайте ДЦР; локализуется совместно с гистоном γ -H2AX, АТМ киназой, BRCA1 фактором.

Литература

- Чмуж Е.В., Шестакова Л.А., Волкова В.С., Захаров И.К. Разнообразие механизмов действия и функций ферментативных систем репарации повреждений ДНК у *Drosophila melanogaster* // Генетика. 2006. Т. 42. № 4. С. 363–375.
- Чмуж Е.В., Шестакова Л.А., Волкова В.С., Захаров И.К. Высокочувствительные экспериментальные системы инсерционного мутагенеза в репарационно-дефицитном генетическом окружении у *Drosophila melanogaster*: новые возможности для изучения пострепликационной репарации двуцепочечных разрывов ДНК и механизмов транспозиции мобильных генетических элементов // Генетика. 2007. Т. 43. № 1. С. 52–60.
- Adair G.M., Rolig R.L., Moore-Faver D. *et al.* Role of ERCC1 in removal of long non-homologous tails during targeted homologous recombination // EMBO J. 2000. V. 19. № 20. P. 5552–5561.
- Akkari Y.M., Bateman R.L., Reifsteck C.A. *et al.* DNA replication is required to elicit cellular responses to psoralen-induced DNA interstrand cross-links // Mol. Cell Biol. 2000. V. 20. № 21. P. 8283–8289.
- Akkari Y.M., Bateman R.L., Reifsteck C.A. *et al.* The 4N cell cycle delay in Fanconi anemia reflects growth arrest in late S phase // Mol. Genet. Metab. 2001. V. 74. № 4. P. 403–412.
- Barber L.J., Ward T.A., Hartley J.A., McHugh P.J. DNA interstrand cross-link repair in the *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle: overlapping roles for PSO2 (SNM1) with MutS factors and EXO1 during S phase // Mol. Cell Biol. 2005. V. 25. № 6. P. 2297–2309.
- Berardini M., Mackay W., Loechler E.L. Evidence for a recombination-independent pathway for the repair of DNA interstrand cross-links based on a site-specific study with nitrogen mustard // Biochemistry. 1997. V. 36. № 12. P. 3506–3513.
- Bhagwat N., Olsen A.L., Wang A.T. *et al.* XPF-ERCC1 participates in the Fanconi anemia pathway of cross-link repair // Mol. Cell Biol. 2009. V. 29. № 24. P. 6427–6437.
- Caménisch U., Dip R., Schumacher S.B. *et al.* Recognition of helical kinks by *xeroderma pigmentosum* group A protein triggers DNA excision repair // Nat. Struct. Mol. Biol. 2006. V. 13. P. 278–284.
- Cheng S., Van Houten B., Gamper H.B. *et al.* Use of psoralen-modified oligonucleotides to trap three-stranded RecA-DNA complexes and repair of these cross-linked complexes by ABC excinuclease // Biol. Chem. 1988. V. 263. № 29. P. 15110–15117.
- Dalbiès R., Payet D., Leng M. DNA double helix promotes a linkage isomerization reaction in trans-diamminedichloroplatinum(II)-modified DNA // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1994. V. 91. № 17. P. 8147–8151.
- De Laat W.L., Appeldoorn E., Jaspers N.G., Hoeijmakers J.H. DNA structural elements required for ERCC1-XPF endonuclease activity // Biol. Chem. 1998. V. 273. № 14. P. 7835–7842.
- De Silva I.U., McHugh P.J., Clingen P.H., Hartley J.A. Defining the roles of nucleotide excision repair and recombination in the repair of DNA interstrand cross-links in mammalian cells // Mol. Cell Biol. 2000. V. 20. № 21. P. 7980–7990.
- De Silva I.U., McHugh P.J., Clingen P.H., Hartley J.A. Defects in interstrand cross-link uncoupling do not account for the extreme sensitivity of ERCC1 and XPF cells to cisplatin // Nucl. Acids Res. 2002. V. 30. № 17. P. 3848–3856.
- Derbyshire M.K., Epstein L.H., Young C.S.H. *et al.* Nonhomologous recombination in human cells // Mol. Cell Biol. 1994. V. 14. № 1. P. 156–169.
- Dronkert M.L., Kanaar R. Repair of DNA interstrand cross-links // Mutat. Res. 2001. V. 486. № 4. P. 217–247.
- Escarceller M., Buchwald M., Singleton B.K. *et al.* Fanconi anemia C gene product plays a role in the fidelity of blunt DNA end-joining // J. Mol. Biol. 1998. V. 279. № 2. P. 375–385.
- Evans J.W., Chernikova S.B., Kachnic L.A. *et al.* Homologous recombination is the principal pathway for the repair of DNA damage induced by tirapazamine in mammalian cells // Cancer Res. 2008. V. 68. № 1. P. 257–265.
- Evans E., Fellows J., Coffey A., Wood R.D. Open complex formation around a lesion during nucleotide excision repair provides a structure for cleavage by human XPG protein // EMBO J. 1997. V. 16. № 3. P. 625–638.
- Fishman-Lobell J., Haber J.E. Removal of nonhomologous DNA ends in double-strand break recombination: the role of the yeast ultraviolet repair gene RAD1 // Science. 1992. V. 258. № 5081. P. 480–484.

- Fishman-Lobell J., Rudin N., Haber J.E. Two alternative pathways of double-strand break repair that are kinetically separable and independently modulated // *Mol. Cell Biol.* 1992. V. 12. № 3. P. 1292–1303.
- Fleming R.A. An overview of cyclophosphamide and ifosfamide pharmacology // *Pharmacotherapy.* 1997. V. 17. P. 146–154.
- Guzder S.N., Habraken Y., Sung P. *et al.* Reconstitution of yeast nucleotide excision repair with purified Rad proteins, replication protein A, and transcription factor TFIIH // *Biol. Chem.* 1995. V. 270. № 22. P. 12973–12976.
- Hanada K., Budzowska M., Modesti M. *et al.* The structure-specific endonuclease Mus81-Eme1 promotes conversion of interstrand DNA crosslinks into double-strands breaks // *EMBO J.* 2006. V. 25. № 20. P. 4921–4932.
- Harrington J.J., Lieber M.R. Functional domains within FEN-1 and RAD2 define a family of structure specific endonucleases: implications for nucleotide excision repair // *Genes Dev.* 1994. V. 8. № 11. P. 1344–1355.
- Helleday T. Pathways for mitotic homologous recombination in mammalian cells // *Mutat. Res.* 2003. V. 532. № 1/2. P. 103–115.
- Henriques J.A., Moustacchi E. Isolation and characterization of *psor* mutants sensitive to photo-addition of psoralen derivatives in *Saccharomyces cerevisiae* // *Genetics.* 1980. V. 95. № 2. P. 273–288.
- Heyer W.D. Recombination: Holliday junction resolution and crossover formation // *Curr. Biol.* 2004. V. 14. № 2. P. 56–58.
- Ishiai M., Kimura M., Namikoshi K. *et al.* DNA cross-link repair protein SNM1A interacts with PIAS1 in nuclear focus formation // *Mol. Cell Biol.* 2004. V. 24. № 24. P. 10733–10741.
- Ivanov E.L., Haber J.E. RAD1 and RAD10, but not other excision repair genes, are required for double-strand break-induced recombination in *Saccharomyces cerevisiae* // *Mol. Cell Biol.* 1995. V. 15. № 4. P. 2245–2251.
- Jachymczyk W.J., von Borstel R.C., Mowat M.R., Hastings P.J. Repair of interstrand cross-links in DNA of *Saccharomyces cerevisiae* requires two systems for DNA repair: the RAD3 system and the RAD51 system // *Mol. Gen. Genet.* 1981. V. 182. № 2. P. 196–205.
- Jones C.J., Wood R.D. Preferential binding of the *xeroderma pigmentosum* group A complementing protein to damaged DNA // *Biochemistry.* 1993. V. 32. P. 12096–12104.
- Kannouche P.L., Wing J., Lehmann A.R. Interaction of human DNA polymerase η with monoubiquitinated PCNA: a possible mechanism for the polymerase switch in response to DNA damage // *Mol. Cell.* 2004. V. 14. № 4. P. 491–500.
- Karle P., Renner M., Salmons B., Günzburg W.H. Necrotic, rather than apoptotic, cell death caused by cytochrome P450-activated ifosfamide // *Cancer Gene Ther.* 2001. V. 8. № 3. P. 220–230.
- Kasparkova J., Zehnulova J., Farrell N., Brabec V. DNA interstrand cross-links of the novel antitumor trinuclear platinum complex BBR3464. Conformation, recognition by high mobility group domain proteins, and nucleotide excision repair // *Biol. Chem.* 2002. V. 277. № 50. P. 48076–48086.
- Krasikova Y.S., Rechkunova N.I., Maltseva E.A. *et al.* Interaction of nucleotide excision repair factors XPC-HR23B, XPA, and RPA with damaged DNA // *Biochemistry (Mosc.).* 2008. V. 73. № 8. P. 886–896.
- Krasnoshtein F., Buchwald M. Developmental expression of the *Fac* gene correlates with congenital defects in Fanconi anemia patients // *Hum. Mol. Genet.* 1996. V. 5. № 1. P. 85–93.
- Kuraoka I., Kobertz W.R., Ariza R.R. *et al.* Repair of an interstrand DNA cross-link initiated by ERCC1-XPF repair/recombination nuclease // *Biol. Chem.* 2000. V. 275. № 34. P. 26632–26636.
- Lambert S., Mason S.J., Barber L.J. *et al.* *Schizosaccharomyces pombe* checkpoint response to DNA interstrand cross-links // *Mol. Cell Biol.* 2003. V. 23. № 13. P. 4728–4737.
- Langston L.D., Symington L.S. Gene targeting in yeast is initiated by two independent strand invasions // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2004. V. 101. № 43. P. 15392–15397.
- Larminat F., Germanier M., Papouli E., Defais M. Deficiency in BRCA2 leads to increase in non-conservative homologous recombination // *Oncogene.* 2002. V. 21. № 33. P. 5188–5192.
- Li L., Peterson C.A., Lu X., Legerski R.J. Mutations in XPA that prevent association with ERCC1 are defective in nucleotide excision repair // *Mol. Cell Biol.* 1995. V. 15. P. 1993–1998.
- Magaña-Schwencke N., Henriques J.A., Chanet R., Moustacchi E. The fate of 8-methoxypsoralen photoinduced crosslinks in nuclear and mitochondrial yeast DNA: comparison of wild-type and repair-deficient strains // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 1982. V. 79. № 6. P. 1722–1726.
- Maltseva E.A., Rechkunova N.I., Petruseva I.O. *et al.* Crosslinking of nucleotide excision repair proteins with DNA containing photoreactive damages // *Bioorgan. Chem.* 2008. V. 36. № 2. P. 77–84.
- McHugh P.J., Gill R.D., Waters R., Hartley J.A. Excision repair of nitrogen mustard-DNA adducts in *Saccharomyces cerevisiae* // *Nucl. Acids Res.* 1999. V. 27. № 16. P. 3259–3266.
- McHugh P.J., Sones W.R., Hartley J.A. Repair of intermediate structures produced at DNA interstrand cross-links in *Saccharomyces cerevisiae* // *Mol. Cell Biol.* 2000. V. 20. № 10. P. 3425–3433.
- McHugh P.J., Spanswick V.J., Hartley J.A. Repair of DNA interstrand crosslinks: molecular mechanisms

- and clinical relevance // *Lancet Oncol.* 2001. V. 2. № 8. P. 483–490.
- Miller R.D., Prakash L., Prakash S. Genetic control of excision of *Saccharomyces cerevisiae* interstrand DNA cross-links induced by psoralen plus near-UV light // *Mol. Cell Biol.* 1982. V. 2. № 8. P. 939–948.
- Morrison A., Christensen R.B., Alley J. *et al.* REV3, a *Saccharomyces cerevisiae* gene whose function is required for induced mutagenesis, is predicted to encode a nonessential DNA polymerase // *Bacteriology.* 1989. V. 171. № 10. P. 5659–5667.
- Mu D., Bessho T., Nechev L.V. *et al.* DNA interstrand cross-links induce futile repair synthesis in mammalian cell extracts // *Mol. Cell Biol.* 2000. V. 20. № 7. P. 2446–2454.
- Mu D., Hsu D.S., Sancar A. Reaction mechanism of human DNA repair excision nuclease // *Biol. Chem.* 1996. V. 271. № 14. P. 8285–8294.
- Mu D., Park C.H., Matsunaga T. *et al.* Reconstitution of human DNA repair excision nuclease in a highly defined system // *Biol. Chem.* 1995. V. 270. № 6. P. 2415–2418.
- Nelson J.R., Lawrence C.W., Hinkle D.C. Thymine-thymine dimer bypass by yeast DNA polymerase zeta // *Science.* 1996. V. 272. № 5268. P. 1646–1649.
- Niedernhofer L.J., Odijk H., Budzowska M. *et al.* The structure-specific endonuclease Ercc1-Xpf is required to resolve DNA interstrand cross-link-induced double-strand breaks // *Mol. Cell Biol.* 2004. V. 24. № 13. P. 5776–5787.
- O'Donovan A., Davies A.A., Moggs J.G. *et al.* XPG endonuclease makes the 3' incision in human DNA nucleotide excision repair // *Nature.* 1994. V. 371. № 6496. P. 432–435.
- Pâques F., Haber J.E. Multiple pathways of recombination induced by double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae* // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 1999. V. 63. № 2. P. 349–404.
- Paques F., Leung W.Y., Haber J.E. Expansions and contractions in a tandem repeat induced by double-strand break repair // *Mol. Cell Biol.* 1998. V. 18. № 4. P. 2045–2054.
- Park C.H., Bessho T., Matsunaga T., Sancar A. Purification and characterization of the XPF-ERCC1 complex of human DNA repair excision nuclease // *Biol. Chem.* 1995. V. 270. № 39. P. 22657–22660.
- Park C.H., Sancar A. Formation of a ternary complex by human XPA, ERCC1, and ERCC4(XPF) excision repair proteins // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 1994. V. 91. P. 5017–5021.
- Reardon J.T., Spielmann P., Huang J.C. *et al.* Removal of psoralen monoadducts and crosslinks by human cell free extracts // *Nucl. Acids Res.* 1991. V. 19. № 17. P. 4623–4629.
- Richardson C., Moynahan M.E., Jasin M. Double-strand break repair by interchromosomal recombination: suppression of chromosomal translocations // *Genes Dev.* 1998. V. 12. № 24. P. 3831–3842.
- Rothfuss A., Grompe M. Repair kinetics of genomic interstrand DNA cross-links: evidence for DNA double-strand break-dependent activation of the Fanconi anemia/BRCA pathway // *Mol. Cell Biol.* 2004. V. 24. № 1. P. 123–134.
- Ruhland A., Haase E., Siede W., Brendel M. Isolation of yeast mutants sensitive to the bifunctional alkylating agent nitrogen mustard // *Mol. Gen. Genet.* 1981a. V. 181. № 3. P. 346–351.
- Ruhland A., Kircher M., Wilborn F., Brendel M. A yeast mutant specifically sensitive to bifunctional alkylation // *Mutat. Res.* 1981b. V. 91. № 6. P. 457–462.
- Saijo M., Kuraoka I., Masutani C. *et al.* Sequential binding of DNA repair proteins RPA and ERCC1 to XPA in vitro // *Nucl. Acids Res.* 1996. V. 24. P. 4719–4724.
- Sargent R.G., Rolig R.L., Kilburn A.E. *et al.* Recombination-dependent deletion formation in mammalian cells deficient in the nucleotide excision repair gene ERCC1 // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 1997. V. 94. № 24. P. 13122–13127.
- Sarkar S., Davies A.A., Ulrich H.D., McHugh P.J. DNA interstrand crosslink repair during G1 involves nucleotide excision repair and DNA polymerase zeta // *EMBO J.* 2006. V. 25. № 6. P. 1285–1294.
- Shimura T., Torres M.J., Martin M.M. *et al.* Bloom's syndrome helicase and Mus81 are required to induce transient double-strand DNA breaks in response to DNA replication stress // *Mol. Biol.* 2008. V. 375. № 4. P. 1152–1164.
- Simon J.A., Szankasi P., Nguyen D.K. *et al.* Differential toxicities of anticancer agents among DNA repair and checkpoint mutants of *Saccharomyces cerevisiae* // *Cancer Res.* 2000. V. 60. № 2. P. 328–333.
- Sinden R.R., Cole R.S. Repair of cross-linked DNA and survival of *Escherichia coli* treated with psoralen and light: effects of mutations influencing genetic recombination and DNA metabolism // *Bacteriol.* 1978. V. 136. № 2. P. 538–547.
- Sladek F.M., Munn M.M., Rupp W.D., Howard-Flanders P. *In vitro* repair of psoralen-DNA cross-links by RecA, UvrABC, and the 5'-exonuclease of DNA polymerase I // *Biol. Chem.* 1989. V. 264. № 12. P. 6755–6765.
- Smeaton M.B., Hlavin E.M., McGregor Mason T. *et al.* Distortion-dependent unhooking of interstrand cross-links in mammalian cell extracts // *Biochemistry.* 2008. V. 47. № 37. P. 9920–9930.
- Stelter P., Ulrich H.D. Control of spontaneous and damage-induced mutagenesis by SUMO and ubiquitin conjugation // *Nature.* 2003. V. 425. № 6954. P. 188–191.

- Tsodikov O.V., Ivanov D., Orelli B. *et al.* Structural basis for the recruitment of ERCC1-XPF to nucleotide excision repair complexes by XPA // *EMBO J.* 2007. V. 26. № 22. P. 4768–4776.
- Van Houten B., Gamper H., Holbrook S.R. *et al.* Action mechanism of ABC excision nuclease on a DNA substrate containing a psoralen crosslink at a defined position // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 1986. V. 83. № 21. P. 8077–8081.
- Volker M., Mone M.J., Karmakar P. *et al.* Sequential assembly of the nucleotide excision repair factors *in vivo* // *Mol. Cell.* 2001. V. 8. P. 213–224.
- Watanabe K., Tateishi S., Kawasuji M. *et al.* Rad18 guides poleta to replication stalling sites through physical interaction and PCNA monoubiquitination // *EMBO J.* 2004. V. 23. № 19. P. 3886–3896.
- Yu L.J., Drewes P., Gustafsson K. *et al.* *In vivo* modulation of alternative pathways of P-450-catalyzed cyclophosphamide metabolism: impact on pharmacokinetics and antitumor activity // *Pharmacol. Exptl. Ther.* 1999. V. 288. № 3. P. 928–937.
- Zhang N., Liu X., Li L., Legerski R. Double-strand breaks induce homologous recombinational repair of interstrand cross-links via cooperation of MSH2, ERCC1-XPF, REV3, and the Fanconi anemia pathway // *DNA Repair.* 2007. V. 6. № 11. P. 1670–1678.

REPAIR OF INTERSTRAND CROSSLINKS IN A DNA MOLECULE

E.V. Dolgova¹, A.S. Likhacheva², K.E. Orishchenko², E.A. Alyamkina¹,
S.S. Bogachev², M.A. Shurdov³

¹ Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia;

² Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia, e-mail: gorbi@bionet.nsc.ru;

³ LLC Panagen

Summary

This review combines the literature data about processes occurring during the repair of interstrand crosslinks induced by cytostatics. The pathways underlying interstrand crosslink repair in prokaryotes (*Escherichia coli*), yeast (*Saccharomyces cerevisiae*), and higher eukaryotes are described. In addition, some experimentally proved pathways of interstrand crosslink repair described in the world literature for the last five years are presented. Key words: Cyclophosphamide, interstrand crosslink, FA/BRCA factor, homologous recombination, repair, ERCC1-XPF, double-strand break.

Key words: Cyclophosphamide, interstrand crosslink, FA/BRCA factor, homologous recombination, repair, ERCC1-XPF, double-strand break.