

## 10) Репарация ДНК.

Экцизионная репарация NER и BER. Белки экцизионной репарации (гликозилазы, АП-нуклеазы, UvrABCD, ДНК-полимераза II)

SOS-ответ бактерий. Роль генов: *recA*, *lexA*, *umuCD*, *uvrABCD*.

## 1)Репарация ДНК

### *Репарация*

Молекула двухцепочечной ДНК обладает жестким сахарофосфатным скелетом и стабилизирована множеством водородных связей, которые образуются между комплементарными парами азотистых оснований. Как таковая, ДНК относительно устойчива к структурным изменениям и повреждениям. Однако они постоянно

возникают под воздействием внешних факторов или происходят вследствие эндогенных метаболических процессов.

Среди главных повреждающих ДНК экзогенных химических и физических агентов можно назвать бенз(а)пирен, диоксины, полихлорированные бифенилы и ультрафиолетовый свет. В свою очередь, важнейшими эндогенными повреждающими агентами являются активные формы кислорода, например, синглетный кислород, и активные формы азота, в частности пероксинитрит (см. раздел 19.1.6.1).

Другим источником структурных повреждений ДНК служат эндогенные ошибки, которые неизбежно, хотя и с разной частотой, происходят при нормальном метаболизме ДНК, а также ее процессинге, состоящем из репликации, рекомбинации и репарации.

В частности, разные ДНК-полимеразы допускают ошибки с разной частотой. Относительно мало ошибаются репликативные ДНК-полимеразы Pol I и Pol III, а также репарационная SOS- репликаза Pol II, которые обладают способностью к автокоррекции. Напротив, репарационные SOS-репликазы Pol IV и Pol V характеризуются тем, что проходят участок повреждения, оставляя его неисправленным (см. раздел 16.4.1.1).

К числу структурных изменений ДНК относятся (рис. 189):

— разрывы фосфодиэфирных связей (одноцепочечные или двухцепочечные);

— димеризация оснований, т. е. образование ковалентных связей между двумя соседними пиримидиновыми основаниями в одной и той же цепи или в комплементарных цепях;

— нарушение спаривания, т. е. отсутствие канонического спаривания нуклеотидов либо из-за удаления основания, либо по причине использования «неправильного» основания;

— образование аддуктов, или продуктов присоединения простых органических молекул, например, алкилирующих агентов.

Рис. 189. Основные типы структурных изменений и повреждений в двухцепочечной ДНК.

Самыми опасными повреждениями ДНК являются разрывы цепей, димеризация оснований или локальное отсутствие спаривания; если они вовремя не устраняются, происходит полная блокада репликации и транскрипции.

С другой стороны, результатом неустраненной ошибки спаривания становятся точечные мутации, которые вносят изменения в нуклеотидную последовательность ДНК. Точечные мутации не влияют на репликацию и транскрипцию в той клетке, где они появились. Однако они наследуются и могут фенотипически проявиться у потомства.

Таким образом, повреждения ДНК снижают точность репликации и транскрипции, а в отдельных случаях могут вообще заблокировать эти процессы, что приводит к летальным последствиям.

Чтобы свести опасность к минимуму, в клетках имеются множественные репарационные системы (англ. *repair* — ремонтировать). Они распознают и устраняют структурные повреждения ДНК.

Репарация ДНК может осуществляться разными способами.

Некоторые повреждения структурно обратимы, и поэтому непосредственно исправляются путем возвращения ДНК в исходное состояние. Примером служит фотореактивация с помощью фотолиазы, которая мономеризует пиримидиновые димеры, образовавшиеся под воздействием ультрафиолетового света (см. раздел

16.5.1.1).

При так называемой эксцизионной репарации точечный поврежденный участок в одной нити ДНК удаляется вместе с фланкирующими интактными областями, длина которых может сильно варьировать. «Правильному» заполнению образовавшейся одноцепочечной бреши способствует двухспиральная структура ДНК, так как неповрежденная комплементарная цепь играет роль матрицы.

При эксцизионной репарации с удалением основания (см. раздел 16.5.1.2) ДНК-гликозилаза удаляет модифицированное основание. Затем разрывается фосфодиэфирная связь по 5'-положению апириимидинового или апуринового сайта. После этого происходит ник-трансляция (от англ. nick — разрез; в данном случае — перенос разреза) — отрезается нуклеотид, фланкирующий повреждение по 3'-положению. Образовавшаяся минимальная брешь заполняется с помощью ДНК-полимеразы, а ДНК-лигаза ликвидирует разрез.

При эксцизионной репарации с удалением нуклеотидов (см. раздел 16.5.1.2) небольшой сегмент ДНК (~11 н.; поврежденный сайт с фланкирующими последовательностями) вырезается эксцизионной эндонуклеазой; брешь и разрез устраняются, как в предыдущем случае.

При репарации нарушенного спаривания, которая избирательно затрагивает неметилированную цепь ДНК (см. раздел 16.5.1.3), вместе с точечным повреждением удаляется участок ДНК протяженностью до 1 тыс нуклеотидов.

Рекомбинационная репарация (см. раздел 16.5.1.4) служит для ликвидации двухцепочечных повреждений, которые возникли либо при репликации ДНК, уже имеющей одноцепочечное повреждение, либо в результате внешнего воздействия на нереплицирующуюся молекулу. Смысл рекомбинационной репарации заключается в том, чтобы путем обмена гомологичными участками распределить двухцепочечное повреждение между двумя дуплексами ДНК. В результате два одноцепочечных повреждения устраняются в ходе репликации или с помощью пострепликационной эксцизионной репарации.

#### *16.5.1.1. Фотореактивация*

В природных условиях главным физическим фактором, который вызывает повреждение ДНК, является солнечная радиация, в частности ее коротковолновый компонент, или ультрафиолетовый свет. Он активно поглощается сопряженной системой двойных связей, что дестабилизирует молекулярные структуры и может приводить к их химической перестройке.

Одним из важнейших эволюционных приспособлений к существованию в нишах, облучаемых ультрафиолетом, служит фотореактивация (для защиты от повреждений видимым светом используются другие механизмы; см. раздел 19.1.6.1).

Сообщения об открытии феномена фотореактивации (англ. photoreactivation) почти одновременно опубликовали в начале 1949 г. два американских генетика — Кельнер (A. Keiner) и Дальбекко (R. Dulbecco).

Первый продемонстрировал его на актинобактерии *Streptomyces griseus*, второй на примере Т-бактериофага *E. coli*.

Феномен фотореактивации заключается в том, что выживаемость клеточных организмов и вирусов, подвергнутых воздействию природного или искусственного «дальнего» ультрафиолетового света (200 -300 нм), можно повысить сразу на несколько порядков, облучая их «близким» ультрафиолетовым светом (300- 350 нм) или видимым светом длиной волны 350 -500 нм. Способностью к фотореактивации обладает большинство живых существ; исключения редки и незакономерны (бактерии *Haemophilus influenzae* и *B. subtilis*, археот *Methanococcus vannielii*, дрожжевой гриб *Schizosaccharomyces pombe*, плацентарное млекопитающее *H. sapiens*).

У разных бактерий спектр действия фотореактивации может различаться. Например, для *S. griseus* он имеет оптимум при 436 нм, а для *E. coli* — 365 нм, что указывает на разную природу фоторецепторных молекул, в частности флавинов.

Последствием облучения ультрафиолетовым светом является образование внутримолекулярных фотопродуктов (пиримидин:6-4 пиримидон) и особенно — спонтанное насыщение двойных связей в положении 5-6 у соседствующих остатков тимина или цитозина. Во втором случае образуется циклобутановое кольцо, или пиримидиновый димер  $\text{Py} \rightleftharpoons \text{Py}$  (рис. 190). Димеризующиеся пиримидиновые остатки могут находиться либо в одной и той же цепи ДНК («цис-син» кольцо), либо в двух комплементарных цепях («транс-син» кольцо).

Рис. 190. Образование циклобутанового кольца при «димеризации» соседних остатков тимина в одной и той же цепи ДНК.

В отсутствии репарации образование димеров блокирует репликацию, что вызывает летальный эффект. В редких случаях, когда ДНК реплицируется в обход поврежденного сайта, возникает мутация.

Устранить пиримидиновые димеры можно двумя способами — путем фотореактивации или путем эксцизионной репарации (см. ниже).

Механизм фотореактивации заключается в ферментативной регенерации мономерных пиримидиновых оснований из димеров.

Фотореактивация осуществляется при помощи фотореактивирующего фермента (англ. photoreactivating enzyme, PRE), или светозависимой ДНК-фотолиазы (англ. DNA photolyase; dcoxyribocyclobutadipyrimidine pyrimidinelyase). Фермент состоит из одной субъединицы (55 -60 кДа; ген *phr2*) и содержит два нековалентно связанных хромофора. Первым из них

универсально служит ФАДН<sub>2</sub> (см. II том учебника). Вторым хромофором у ферментов «фолатного» класса является фолат (N-метинил-N<sub>4</sub>фолат), а у ферментов «деазафлавинного» класса деазафлавины (8- гидрокси-5-деазафлавин, F<sub>420</sub>; там же).

Циклобутановое кольцо разрывается за счет поглощенной энергии света, причем хромофоры поочередно играют роль антенны (см. II том учебника). Реакцию, катализируемую ДНК-фотолиазой, можно записать следующим образом:

Фермент независимо от света связывается со своей мишенью ( $\text{Pyr} \rightleftharpoons \text{Pyr}^*$ ). Затем второй хромофор поглощает световой квант; энергия возбуждения передается первому хромофору, который переносит электрон на циклобутановое кольцо. В результате этого связи 5-5 и 6-6 разрываются, и пиримидиновый димер распадается на мономеры. От одного из них ( $\text{Pyr}^*$ ) электрон переносится обратно на флавин, который возвращается в исходное состояние, а фермент диссоциирует от ДНК. Таким образом, реакция фотолиза  $\text{Pyr} \rightleftharpoons \text{Pyr}^* \rightarrow 2 \times \text{Pyr}$  не относится к числу окислительно-восстановительных превращений.

Второй тип фотопродуктов, 6-4 пиримидин-пиримидон, репарируется при помощи особой фотолиазы (ген *phr1*). Данные относительно ее молекулярного строения и механизма действия еще не получены.

#### *16.5.1.2. Эксцизионная репарация*

Эксцизионной репарацией называется удаление поврежденного участка ДНК с его последующей заменой новым. Репарация такого типа представляет собой высоко точный процесс, поскольку благодаря комплементарности цепей ДНК информация, необходимая для исправления повреждения в одной цепи, считывается с другой, неповрежденной цепи.

В соответствии с молекулярным механизмом, который используется для исправления повреждений, различают две системы эксцизионной репарации.

При репарации с удалением основания поврежденный нуклеотид поэтапно вырезается, причем сначала с помощью гликозилазы удаляется поврежденное основание. Кроме того, компоненты этой системы могут репарировать сайты с отсутствующим основанием, а также димеры оснований, одноцепочечные разрывы или короткие одноцепочечные бреши в молекуле ДНК.

При репарации с удалением нуклеотидов поврежденный участок цепи (реже — один нуклеотид) вырезается за один этап.

*Репарация с удалением основания.* Исправление разнообразных, чаще всего точечных повреждений ДНК достигается в процессе репарации с удалением основания (англ. base excision repair, BER). Она включает в себя следующие этапы:

- удаление «неправильного» основания;
- расщепление сахарофосфатного скелета в сайте с удаленным основанием;
- удаление сахарофосфатного остатка;
- репарационный синтез ДНК;
- лигирование одноцепочечного разрыва.

Первым шагом при репарации с удалением основания является либо спонтанная потеря основания, либо удаление «неправильного» основания при помощи ДНК-гликозилазы (рис. 191).

Рис. 191. Образование бреши размером в один нуклеотид при эксцизионной репарации с удалением основания. I — ДНК-гликозилаза; II — эндонуклеаза AP II; III — экзонуклеаза.

В зависимости от субстратной специфичности ДНК-гликозилаз существуют разные варианты системы репарации с удалением поврежденного или «неправильного» основания. Например, в случае *E. coli* ДНК-гликозилаза MutM удаляет 4,6-диамино-5-формаидопиримидин, ДНК-гликозилаза MutY — 8-оксогуанин, ДНК-гликозилаза Ung — урацил, ДНК-гликозилазы Tag и AlkA — алкилпурины, ДНК-гликозилаза TG — тимингликоль (см. рис. 191).

Атипичные ДНК-гликозилазы *Micrococcus luteus* (PD) и колифага T4 (DenV+) одновременно обладают двумя активностями — гликозилазной, специфичной в отношении пиримидиновых димеров, и AP-эндонуклеазной. Это позволяет им инициировать процесс репарации, который завершается фотореактивацией (рис. 192).

Рис. 192. Удаление основания и образование одноцепочечного разреза при эксцизионной репарации тиминового димера с помощью гликозилазы/эндонуклеазы PD (DenV+). N — один из четырех дезоксирибонуклеотидов; T = T — тиминовый димер. Черные стрелки — места действия экзонуклеазы (дезоксирибофосфодиэстеразы) и ДНК-фотолиазы.

В результате гидролиза N-гликозильной связи «неправильное» основание освобождается, а в молекуле ДНК появляется апиримидиновый или

апуриновый сайт (англ. apurinic/apurimidinic, AP). Затем эндонуклеаза AP II расщепляет фосфодиэфирную связь в 5'-положении AP-сайта. В результате этого у разорванной цепи появляется свободный 3'-конец, который служит затравкой для синтеза ДНК. В свою очередь, апуриновый или апириимидиновый дезоксирибозо-5-фосфатный остаток удаляется с помощью экзонуклеазы III (дезоксирибофосфодиэстеразы). При этом образуются брешь размером в один нуклеотид и свободный 5'-фосфатный конец, необходимый для воссоединения одноцепочечного разрыва ДНК.

Брешь размером даже в один нуклеотид потенциально летальна. Однако обычно она заполняется с помощью ДНК-полимеразы Pol I (см. раздел 16.4.1.1).

После заполнения бреши, иными словами, по завершении репарационного синтеза в ДНК остается потенциально опасный одноцепочечный разрез (англ. nick) с двумя противостоящими группами — 3'-гидроксильной и 5'-фосфорильной. Он устраняется непосредственно, путем образования фосфодиэфирной связи с помощью, НАД-зависимой ДНК-лигазы, которая кратко охарактеризована в разделе 16.4.1.1.

*Репарация с удалением нуклеотидов.* Как отмечалось ранее, ультрафиолетовое облучение приводит к образованию внутримолекулярных 6-4 фотопродуктов и циклобутановых пиримидиновых димеров. Для устранения этих повреждений наряду с механизмом фотореактивации используется универсально распространенный механизм — репарация с удалением нуклеотидов (англ. nucleotide excision repair, NER). В данном случае специальный белковый комплекс распознает повреждение в ДНК и непосредственно (т. е. без образования AP-сайта, в отличие от репарации с удалением нуклеотида) наносит фланкирующие одноцепочечные разрезы. Действуя в качестве инцизионной эндонуклеазы (от англ. incision — разрез), он проявляет широкую специфичность в отношении разнообразных одноцепочечных повреждений ДНК, что, в частности, показано на примере *E. coli*. К числу продуктов локальной модификации ДНК относятся ириимидин:6-4 пиримидон, аддукты псоралена, производные бенз(а)пирена и т. д.

Хотя принцип действия систем репарации с удалением нуклеотидов в целом одинаков и, в частности, заключается в нанесении разрезов по обеим сторонам от повреждения, белковые компоненты этих систем и кодирующие их гены различаются между собой у разных организмов.

Репарация с удалением нуклеотидов происходит следующим образом. Вначале наносятся два разреза, фланкирующие поврежденный сайт. Затем поврежденный фрагмент ДНК удаляется. После этого осуществляется репарационный синтез ДНК, причем комплементарная цепь служит

матрицей для воссоздания удаленного фрагмента. В заключение происходит лигирование одноцепочечного разреза.

В случае бактерий в систему репарации с удалением нуклеотидов входят следующие компоненты, или NER-белки:

- UvrA (сокр. англ. ultraviolet repair; 114 кДа; распознает повреждения);
- UvrB/UvrC (84 и 70 кДа; наносят разрез по обеим сторонам повреждения);
- UvrD (75 кДа; ДНК-геликаза II; расплетает ДНК по обе стороны от повреждения, образуя репарационный «глазок»).

Несмотря на то, что существует определенный базовый уровень конститутивной экспрессии NER-белков, они находятся под контролем регуляторной системы RecA/LexA и индуцируются при SOS-ответе (см. раздел 18.1.2). В частности, белок LexA непосредственно служит репрессором гена *uvrA* за счет способности связываться с его промотором.

Для проявления активности эндонуклеазы UvrABC необходимы АТФ и катионы  $Mg^{2+}$ . Разрезы наносятся по обе стороны от повреждения, например, пиримидинового димера, в результате чего образуется свободный фрагмент ДНК (рис. 193).

Рис. 193. Образование одноцепочечных разрывов, фланкирующих тиминный димер, при эксцизионной репарации с удалением нуклеотидов.

После того, как эндонуклеаза UvrABC нанесла разрезы, она вместе с олигонуклеотидным фрагментом некоторое время остается в комплексе с ДНК. Затем они вытесняются с помощью четвертого NER-белка, или геликазы UvrD при участии ДНК-полимеразы I и SSB-белков (см. раздел 16.4.1.1).

По сравнению с двухцепочечной ДНК одноцепочечная ДНК более чувствительна к повреждениям; кроме того, отсутствует матрица для ее репарации. Поэтому особая функция SSB-белков состоит в том, чтобы контролировать плавление и отжиг одноцепочечной ДНК, помогать выявить ее повреждение и привлекать к ней белки, участвующие в репарации.

Неудивительно, что SSB-белки имеются у всех клеточных организмов, а также у многих вирусов. Стандартным доменом SSB-белка, служащим для связывания ДНК, является ОБ-складка (сокр. англ. outer binding). Бактерии образуют гомотетрамерные SSB-белки, содержащие одну ОБ-складку в каждой субъединице. В свою очередь, эукариоты образуют гетеротримерные SSB, или репликационные белки A (англ. *réplication*



protein A, RPA) с шестью ОБ-складками. Что касается архей, то SSB-белки Euryarchaeota обнаруживают более высокий уровень гомологии с RPA-белками, в то время как SSB-белки Crenarchaeota имеют химерную бактериально-эукариотную природу.

Бреши, размер которой в 99% случаев составляет ~ 12-13 нуклеотидов, заполняется с помощью ДНК-полимеразы I, а одноцепочечный разрыв зашивает ДНК-лигаза.

Каковы особенности системы репарации с удалением нуклеотидов, имеющейся у архей? В некоторых случаях она сходна с бактериальной, в частности геномы ряда метаногенов и экстремальных галофилов содержат ортологи генов *uvrABC* (что может объясняться горизонтальным переносом генов); в других случаях археогная NER-система ближе к эукариотной.

### *Рекомбинационная репарация*

Репарация одноцепочечных повреждений использует матричные свойства интактной комплементарной цепи и является «личным делом» поврежденной молекулы ДНК. В отличие от этого, для репарации двухцепочечных повреждений требуется посторонняя матрица, и в качестве нее используется другая, гомологичная молекула ДНК.

*Репарация двухцепочечных повреждений.* Хотя повреждения чаще всего затрагивают только одну цепь ДНК, они иногда могут появляться напротив друг друга.

Схема репарации таких двухцепочечных повреждений приведена на рис. 194. Поврежденный дуплекс «выравнивается» со своим интактным гомологом, образуя с ним пресинапс (англ. *presynapsis*). На решающей стадии репарации дуплексы обмениваются друг с другом гомологичными участками цепей с помощью крестообразных хиазм Холлидея (см. раздел 16.6.1.2). Образовавшийся таким образом синапс (англ. *synapsis*; от греч. *synarpos* — вместе) расцепляется за счет нанесения симметричных одноцепочечных разрезов и воссоединения их концов. На стадии постсинапса (англ. *postsynapsis*) формируются два гетеродуплекса, каждый из которых несет одноцепочечное повреждение. И, наконец, повреждения устраняются с помощью соответствующих репарационных систем.

Рис. 194. Репарация двухцепочечных повреждений ДНК. I — пресинапс, молекула ДНК с двухцепочечным повреждением (А) и ее интактный гомолог (Б); II — синапс, гомологичное спаривание с образованием двух хиазм Холлидея; III — постсинапс, нанесение симметричных одноцепочечных разрезов и обмен гомологичными участками ДНК; IV — ликвидация одноцепочечных повреждений с помощью эксцизионной

репарации. Аб(n), Ба(n) — гетеродуплексы с повреждением в одной из цепей; Аб(p), Ба(p) — репарированные гетеродуплексы. Толстые линии — старые цепи ДНК; тонкие линии — новые (дочерние) цепи ДНК.

Повторим, что данная стратегия репарации состоит в «размене» двухцепочечного повреждения на пару одноцепочечных повреждений.

*Механизмы двухцепочечных повреждений.* Существуют два основных механизма двухцепочечных повреждений ДНК.

В первом случае (рис. 195 А, 1-3) двухцепочечные повреждения возникают в процессе репликации. Например, как только репликационная вилка доходит до некодирующего повреждения в одной из цепей ДНК, в частности сайта без основания или пиримидинового димера, действие репликативной ДНК-полимеразы Pol III (см. раздел 16.4.1.1) полностью блокируется. Затем правее повреждения, на среднем расстоянии от него 800 нуклеотидов репликация возобновляется с помощью «склонной к ошибкам» SOS-полимеразы Pol V, которая вскоре уступает место репликативной полимеразе Pol III. Однако при этом в новой, или дочерней цепи появляется незаполнимая брешь (англ. daughter strand gap).

Рис. 195. Образование бреши в дочерней цепи ДНК (А) и двухцепочечного разрыва ДНК (Б) с их рекомбинационной репарацией. 1 — приближение реплисомы к тиминовому димеру; 2 — прекращение репликации интактной цепи; 3 — образование одноцепочечной бреши в поврежденной цепи; 4 — образование хиазм Холлидея; 5 — заполнение одноцепочечной бреши; 6 — демонтаж хиазм Холлидея. I — приближение реплисомы к одноцепочечному разрыву; II — распад репликационной вилки и устранение одноцепочечного разрыва в интактной молекуле ДНК; III — создание одноцепочечного «навеса» в поврежденной молекуле ДНК; IV — образование хиазмы Холлидея; V — синаптический синтез ДНК; VI — демонтаж хиазмы Холлидея.

Толстые линии — старые цепи ДНК; тонкие линии — новые (дочерние) цепи ДНК.

Во втором случае (рис. 195 Б, I — III) образуется непреодолимый одноцепочечный разрыв в реплицируемой молекуле ДНК. Достигнув его, репликационная вилка распадается. В результате этого в одной из двух сестринских молекул ДНК появляется свободный конец. Одноцепочечная брешь во второй сестринской молекуле устраняется ДНК-полимеразой PolII, а одноцепочечный разрыв ликвидируется с помощью ДНК-лигазы.

Двухцепочечные повреждения могут непосредственно индуцироваться и внешним воздействием. Например, свободные радикалы, образовавшиеся в водном растворе под воздействием ионизирующей радиации, создают

двухцепочечные разрывы в молекуле ДНК, а митомицин С образует с ней поперечные сшивки.

Заметим, что в обоих описанных случаях продуктами рекомбинации являются молекула ДНК с двухцепочечным повреждением и гомологичная ей молекула интактной ДНК.

*Два пути рекомбинационной репарации.* Двухцепочечные повреждения ДНК репарируются двумя путями, подробно изученными на примере *E. coli*. (рис. 195 А, Б). Хотя оба пути зависят от белка RecA, их обозначают как «RecF-путь» и «RecBC-путь» (по названию продуктов генов *recF* и *recBC*).

RecF-путь используется для репарации бреши в дочерней цепи, а RecBC-путь — для репарации двухцепочечного разрыва ДНК. Оба пути включают в себя пресинаптическую, синаптическую и постсинаптическую фазы.

*RecF-путь* (рис. 195 А, 4 — 6). В данном случае образуются две хиазмы Холлидея.

Гены *recFOR* индуцируются при SOS-ответе (см. раздел 18.1.2). В пресинаптической фазе гетеротримерный комплекс RecFOR (40, 27 и 22 кДа) перемещается по бреши в дочерней цепи, покрытой SSB-белками, и инициирует образование взаимодействующего с ней филамента белка RecA (см. ниже).

Созданию синапса способствуют две топоизомеразы. Первая из них — это ДНК-топоизомераза IB, или ДНК-гираза; она устраняет положительные супервитки, возникшие при взаимодействии интактного дуплекса с внедренным в него одноцепочечным участком. Вторая — это топоизомераза IA; она устраняет отрицательные супервитки, возникшие в гетеродуплексе.

Брешь в дочерней цепи ликвидируется с помощью ДНК-полимеразы Pol I и ДНК-лигазы.

В постсинаптической фазе резольвасома RuvABC (см. ниже) демонтирует хиазмы Холлидея и филаменты белка RecA. В результате образуется интактный гетеродуплекс и гетеродуплекс с одноцепочечным повреждением, которое устраняется за счет эксцизионной репарации.

*RecBC-путь* (рис. 195 Б, IV — VI). В данном случае образуется только одна хиазма Холлидея.

На хромосоме *E. coli* гены *recBC* образуют дицистронный оперон. Ген *recD* обладает собственным промотором и терминатором (см. раздел 16.3.1.2). Ни один из этих трех генов не индуцируется при SOS-ответе.

Белки RecB (134 кДа), RecC (129 кДа) и RecD (67 кДа) образуют гетеротример. Он обладает тремя ферментативными активностями — геликазной, эндонуклеазной и АТФазной (это единственная известная АТФ-зависимая эндонуклеаза). Задача комплекса RecBCD заключается в том, чтобы сформировать в участке разрыва одноцепочечный выступ, или «навес» (англ. overhang) с 3'-концом, который будет внедрен в интактную молекулу ДНК (рис. 195, Б, IV). Эндонуклеазное расщепление неравномерно затрагивает обе цепи поврежденной молекулы ДНК. По достижении «горячей точки» рекомбинации-повторяющейся Chi-последовательности (см. раздел 16.3.2.1) — расщепление прекращается на 3'-конце бывшей ведущей цепи, однако некоторое время продолжается на 5'-конце бывшей ведомой цепи.

По аналогии с белками RecFOR, белки RecBCD стимулируют образование филаментов белка RecA на одноцепочечных участках ДНК.

После демонтажа хиазмы Холлидея репликационная вилка восстанавливается. Для этого в бреши осуществляется ограниченный синтез ДНК с помощью ДНК-полимеразы Pol I; в «верхнем» разрыве для этого требуются фрагменты Оказаки.

### *SOS-ответ E. coli на повреждение ДНК.*

Часто возникающие одноцепочечные повреждения ДНК, а также более редкие двухцепочечные повреждения репарируются с помощью вышеописанных конститутивных систем. Но когда нарушения носят массовый характер, появляется необходимость в короткий срок резко усилить репарационные процессы.

Соответствующий клеточный механизм называется SOS-ответом (англ. SOS response; см. раздел 18.1.2). Заметим, что это образное название искажает истинную физиологическую ситуацию, поскольку вместо попытки любой ценой остаться в живых клетка запускает рациональную систему адаптивных реакций в ответ на прекращение репликации ДНК.

Итак, на нарушение ДНК, подавляющее ее репликацию, клетка реагирует SOS-ответом. Он выражается в повышенной экспрессии ~20 генов SOS-регулона, продукты которых способствуют возобновлению репликации (табл. 23). Стратегическая задача SOS-ответа состоит в том, чтобы позволить клетке противостоять повреждениям ДНК и, по возможности, произвести их репарацию.

Существуют несколько тактических способов решения данной задачи:

— репликативный аппарат приобретает дополнительную способность преодолевать сайты с отсутствующим основанием благодаря увеличению числа копий ДНК- полимеразы Pol II;

— с целью прохождения участков, блокирующих репликативные полимеразы, повышается экспрессия «склонной к ошибкам» ДНК- полимеразы Pol V;

— возрастает способность к эксцизионной репарации за счет дополнительного синтеза большого количества копий эндонуклеазы UvrABC и геликазы UvrD;

— значительно усиливается рекомбинационная репарация благодаря сверхсинтезу белков RecA и RecN.

На более поздней стадии SOS-ответа усиливается синтез белка SulA, ингибирующего клеточное деление (см. раздел 17.4.1), что предоставляет клетке отсрочку для завершения рекомбинационной репарации.

В тех случаях, когда все принятые меры оказались бесполезными, и возобновить репликацию ДНК так и не удалось, активируются лизогенные профаги, а также колициногенные плазмиды, что приводит к разрушению клетки. Тем не менее, столь неблагоприятный исход выгоден для популяции в целом, поскольку «обреченная» клетка перестает расходовать лимитированные трофические ресурсы на бесполезное поддержание своей жизнедеятельности.

Описанные события происходят в результате поэтапной индукции SOS-генов (табл. 23).

*Таблица 23. Гены и их продукты, участвующие в SOS-ответе E. coli*

Ген	Функция продукта	Уровень экспрессии (копии на клетку)	
		Базовый	Индукцированный
Первый эшелон			
lexA	Репрессор SOS-регулона	1300	1
uvrA //uvrB	Эксцизионная репарация (выявитель сайта// экзонуклеаза)	20/250	250/100
uvrD	Эксцизионная репарация (геликаза)	5000-8000	25000-65000
polB	Репликация «поверх повреждения» (ДНК- полимеразы Pol II)	40	300
Второй эшелон			

ruvA //ruvB	Рекомбинационная репарация (выявитель сайта / / геликаза)	700/5600	200/1600
dinI	Ингибитор процессинга белка Б'пшО	500	2300
recA//recN	Рекомбинационная репарация (дерепрессор SOS-регулона, фактор пресинапса//-*	1000-10000/-	100000/-
Третий эшелон			
sulA	Ингибитор цитокина	-	-
umuDC	Репликация «поверх повреждения» (ДНК-полимераза Pol V)	180/0	2400/200
Апоптоз			
Саа	Колицин А	-	-
Сea	Колицин Е1	-	-

\* — данные отсутствуют.

В первом эшелоне индуцируются гены, ответственные за репарацию одноцепочечных повреждений ДНК (uvrABCD) или за их игнорирование (polB).

Когда это не помогает восстановить репликацию, индуцируются гены второго эшелона, в частности recAN, отвечающие за рекомбинационную репарацию.

Если не помогает и это, включаются гены третьего эшелона (umuCD и sulA).

Когда репликация возвращается к норме, все три группы генов репрессированы в обратном порядке. Альтернативой становится апоптоз и лизис клетки.

Повышение уровня экспрессии SOS-генов при прекращении репликации вызвано тем, что репрессор LexA инактивируется под воздействием белка RecA в активной форме (см. рис. 251).

В отсутствии экологических стрессов, приводящих к повреждению ДНК, белок-репрессор LexA подавляет экспрессию SOS-генов — его димеры связываются с квази-палиндромной последовательностью 5'-TACTG(TA)5 CAGTA-3' в промоторных участках SOS-генов, или с SOS-боксом (англ. SOS box), что препятствует инициации транскрипции. Тем не менее, SOS-гены экспрессируются и на низком конститутивном уровне, поскольку белок LexA неэффективно распознает свою мишень, а также из-за того, что транскрипция происходит с альтернативных промоторов.

*Роль белка RecA.* Как уже отмечалось, при рекомбинационной репарации идет обмен гомологичными одноцепочечными участками между

поврежденной и интактной ДНК. В случае *E. coli* две сопряженные задачи -- обеспечение контакта гомологов и обмен цепями между ними — решаются с помощью многофункционального фермента RecA (см. раздел 16.6.1.2).

Ген *recA* обладает собственными промотором и терминатором и контактирует с генами, которые не имеют отношения к процессам репликации и транскрипции. В обычных условиях белок RecA синтезируется в числе 100-10000 копий на клетку, однако при блокировании репликации из-за повреждения ДНК его количество увеличивается более, чем на порядок (см. табл. 23).

Когда при SOS-ответе *E. coli* реагирует на повреждение ДНК, белок RecA переходит в активную форму (RecA\*). Она играет роль копротеазы при автопротеолитическом расщеплении репрессора SOS-ответа — белка LexA.

В белке RecA присутствуют два сайта связывания — один для поврежденной одиночной цепи ДНК, другой для интактной ДНК. Его молекулы образуют гексамеры,

наподобие гексамеров геликазы DnaB (см. раздел 16.4.1.1). Гексамеры, в свою очередь, образуют филамент вокруг поврежденной одиночной цепи ДНК, чему способствуют SSB-белки.

Филамент белка RecA «выравнивает» гомологичную последовательность в двух молекулах ДНК и катализирует обмен цепями между ними с образованием хиазм Холлидея (см. рис. 195, А 3-5 и рис. 195, Б III-V). Необходимым условием этой реакции служит гидролиз АТФ, причем в роли АТФазы выступает все тот же белок RecA.

*Демонтаж хиазм Холлидея.* Хиазмы Холлидея представляют собой локусы, в которых пересекаются одиночные цепи ДНК. Как уже отмечалось, при репарации бреши в дочерней цепи (RecF-путь) образуются две хиазмы Холлидея, а при репарации двухцепочечного разрыва ДНК (RecBC-путь) только одна. Чтобы завершить процесс рекомбинационной репарации, необходимо демонтировать хиазмы Холлидея и филаменты белка RecA. Для этой цели в RecBC-пути используется ферментная система RuvABC (см. также раздел 16.6.1.2).

Генный локус *ruv* (сокр. англ. repair of ultraviolet damage) индуцируется в первом эшелоне SOS-ответа. Гены *ruv AB* входят в индуцибельный оперон; прилегающий к нему ген *ruvC* образует моноцистронный оперон.

Белки RuvABC функционально объединяются в резольвасому (см. раздел 16.6.1.2). Белок RuvA образует тетрамеры; его роль сводится к распознаванию хиазм Холлидея и связыванию с ними. Второй белок, RuvB объединяется в гексамеры, нанизанные на дуплекс ДНК, и действует в

качестве геликазы. Третий белок, RuvC, активный в димерной форме, играет роль резольвазы. Он наносит разрезы в двух цепях ДНК одинаковой полярности, на одинаковом расстоянии от хиазмы Холлидея, а затем соединяет образовавшиеся концы.

Итак, мы познакомились с разными, порой довольно сложными механизмами репарации. С их помощью устраняются эндогенные и экзогенные повреждения ДНК. Благодаря репарации, а также за счет репликативных ДНК-полимераз, способных к автокоррекции, прокариоты обеспечивают консерватизм своего генома.

Существует еще один защитный механизм, при помощи которого прокариотные геномы защищаются от изменений. Речь идет о системе рестрикции-модификации.

## 2) Эксцизионная репарация NER и BER. Белки эксцизионной репарации (гликозилазы, АП-нуклеазы, UvrABCD, ДНК-полимераза II)

1. Эксцизионная репарация оснований (base excision repair, BER).
2. Эксцизионная репарация неспаренных оснований (mismatch repair, MMR). (ТЕБЕ НЕ НАДО, ПРОСТО ЗНАЙ ЧТО ЭТО ЕСТЬ)
3. Эксцизионная репарация нуклеотидов (nucleotide excision repair, NER).

Все эти виды эксцизионной репарации имеют общие этапы: распознавание повреждения; надрезание нити ДНК (сахарофосфатного остова); эксцизия (удаление) участка, содержащего повреждение; репаративный синтез на неповрежденной матрице и лигирование. При этом, несмотря на лежащий в их основе общий процесс вырезания участка ДНК с повреждением, они принципиально различаются между собой.

### Эксцизионная репарация оснований

Основные повреждения ДНК, удаляемые при BER – неправильно спаренные, окисленные, алкилированные и т.п. основания [11]. Такие повреждения не приводят к нарушению репликации, но являются источником мутаций.

Иницилирующими BER белками являются гликозилазы, которые распознают и удаляют поврежденные или неправильные основания, гидролизуя N-гликозидную связь между сахарофосфатным остовом и поврежденным основанием [60, 96]. На сегодняшний день в клетках млекопитающих идентифицировано не менее 11 различных гликозилаз, которые отличаются по субстратной специфичности и репарируемым повреждениям [108]. Обычно определенные гликозилазы репарируют определенные повреждения [11, 43]. Среди гликозилаз млекопитающих можно выделить четыре структурно различных группы: урацил-ДНК-гликозилазы, спираль-шпилька-спираль-гликозилазы, 3-метилпурингликозилазы и эндонуклеаза-VIII-подобные гликозилазы. Несмотря на их структурное разнообразие, все ДНК-гликозилазы используют механизм «отгибания оснований» (base-flipping), при котором основание-мишень перед отщеплением отгибается в сторону от спирали ДНК. Выделяют гликозилазы I и II типа [24]. I тип гликозилаз только удаляет модифицированные основания и оставляет в молекуле ДНК апуриновый/апиримидиновый сайт (АП-сайт). II тип гликозилаз сперва удаляет измененное основание, а затем расщепляет нить как 3'-эндонуклеаза и



формирует односторонний разрыв. После гликозилазы I типа разрез фосфодиэфирной связи совершает АП-эндонуклеаза. Это специальная АП-эндонуклеаза APE1 (син.: APEX, Ref-1, HAP-1) [23, 56, 82, 115]. APE1 (AP endonuclease-1) активируется при взаимодействии с белком XRCC1 (X-ray-induced damage repair cross complementing) и действует с ним в комплексе [113].

Независимо от механизма разрыва фосфодиэфирной связи, в качестве промежуточной стадии образуется разрыв нити ДНК в котором 3' и 5'-концы модифицированы и блокируют последующую работу репарационных ферментов. Чтобы процесс репарации мог завершиться, эти блокирующие концы должны быть преобразованы в обычные 3'-ОН и 5'-фосфатные концы. Это необходимо для реакции с ДНК-полимеразой и далее с ДНК-лигазой. Удаление этих изменённых концов производится разными ферментами, в зависимости от того, произошёл ли разрез с 3' или 5'-стороны от АП-сайта. Например, APE1 помимо своей основной АП-эндонуклеазной активности обладает также 3'-фосфодиэстеразной активностью, позволяющей ей восстанавливать 3'-ОН конец из 3'-фосфо- $\alpha$ ,  $\beta$ -ненасыщенного альдегида. 3'-фосфатный конец, образующийся в результате действия некоторых двухфункциональных ДНК-гликозилаз, преобразуется в 3'-ОН конец посредством 3'-фосфатазной активности PNKP (3'-фосфатазная полинуклеотидкиназа) [1]. АП-сайты и односторонние разрывы ДНК должны быть обработаны как можно скорее, поскольку они высокотоксичны и мутагенны [79].

На следующем этапе BER происходит заполнение разрыва посредством синтеза ДНК. Синтез происходит по двум путям, короткозаплаточному (short-patch) и длиннозаплаточному (long-patch), в зависимости от того, вставляется в ДНК один нуклеотид или несколько. Короткозаплаточная BER составляет 80-90 % всей BER.

При short-patch BER ДНК-полимераза  $\beta$  (Pol  $\beta$ ) вытесняет 5'-дезоксирибоза-5-фосфат и в цепи образуется брешь, напротив которой в противоположной нити ДНК расположен неповрежденный нуклеотид. Затем, эта же Pol  $\beta$  вставляет комплементарный нуклеотид, присоединяя его к свободному 3' ОН-концу [17, 70, 100].

Также Pol  $\beta$  участвует в long-patch BER, но вставляет только первый нуклеотид в поврежденный АП-сайт, начиная от 3'-ОН конца [18,91]. Затем Pol  $\beta$  диссоциирует с поврежденной цепью ДНК и дальнейший синтез осуществляется PCNA-зависимыми полимеразми Pol  $\delta$  или Pol  $\epsilon$  путем репарации длинными фрагментами [26, 71]. PCNA (proliferating cell nuclear antigen) способствует фиксации этих полимераз на цепи ДНК и удерживает их, пока идет синтез фрагмента длиной 2-12 нуклеотида [62]. Одновременно с присоединением нового нуклеотида эти полимеразы вытесняют нуклеотид с поврежденным 5'-концом и последующие нуклеотиды, которые образуют отделенный от матричной цепи «болтающийся» олигонуклеотид – flap structure.

В результате, разрыв в репарируемой цепи ДНК смещается в сторону от первоначального участка повреждения, а небольшой «лишний» отрезок цепи нуклеотидов удаляется с помощью эндонуклеазы FEN1 (Flap endonuclease-1, флэп-эндонуклеаза-1), также зависящей от PCNA [50,69]. FEN1 присоединяется к 5'-концу свисающего участка, перемещается к месту разветвления на этой цепи ДНК и гидролизует связь [62]. Помимо репарации этот фермент принимает активное участие в репликации ДНК: при удалении праймера фрагментов Оказки также образуются свисающие (flap) концы

### Экцизионная репарация нуклеотидов

Экцизионная репарация нуклеотидов является универсальным механизмом репарации ДНК. NER одним и тем же набором ферментов может распознавать самые разнообразные повреждения, искажающие спираль ДНК. При этом повреждения не обладают сходной химической структурой, но их объединяет то, что все они дестабилизируют двойную спираль ДНК и являются массивными [39].

Белки, реализующие NER, вначале распознают повреждение, затем раскручивают молекулу ДНК, удаляют олигонуклеотид, содержащий поврежденный нуклеотид, восстанавливают

последовательность нуклеотидов на поврежденной нити и сшивают молекулу. Низкая специфичность этого вида репарации определяется тем, что удаляется не только модифицированный нуклеотид, но цепочка нуклеотидов, в ряду которых находится и поврежденный [12, 111].

На этапе распознавания повреждения различают два варианта эсцизионной репарации нуклеотидов: NER, реализуемая по всему геному, и NER, связанная с транскрипцией [30,36].

NER по всему геному – GG-NER (global genome nucleotide excision repair). При этом виде NER поиск и удаление объемных повреждений осуществляется во всем геноме, включая нетранскрибируемые участки и молчащий хроматин. GG-NER инициируется комплексом XPC/HR23B/CEN2 (XP complementation group C, Rad23 homolog B, Centrin-2, – белок XP с комплементационной группой C; гомолог B белка Rad 23; центрин-2).

В этом комплексе HR23B и CEN2 являются вспомогательными белками, которые увеличивают сродство и прочность связывания XPC с поврежденной спиралью ДНК. Оба этих белка присутствуют в клетке в парциальном избытке и их истощение делает клетку чувствительной к УФ [80]. Помимо этих белков, ДНК-связывающая способность XPC в целом коррелирует со степенью искажения спирали ДНК [97]. Белок HR23B, кроме структурной, имеет также и более специфическую функцию, стимулируя процесс опознания повреждений. После опознания повреждения HR23B диссоциирует от XPC [6,73].

Комплекс XPC/HR23B постоянно движется вдоль молекулы ДНК, распознает повреждения и служит матрицей, на которой осуществляется сборка ключевых факторов, реализующих удаление повреждения и репарацию этого участка. При этом элемент XPC распознаёт термодинамически неустойчивый участок молекулы [105].

XPC имеет два основных функциональных домена [72]. ДНК-связывающий домен, неспецифичный как к последовательности связываемой ДНК, так и к типу повреждения, состоит, в свою очередь, из трансглутамаза-гомологичного домена и  $\beta$ -шпилька-домена (BHD1), заякоривающего белок на ДНК. Двойной  $\beta$ -шпилька-домен (BHD2/3) связывает неповрежденную нить ДНК, не вступая с повреждением в прямой контакт и вместо этого охватывая два нуклеотида, расположенные напротив повреждения. Этот «карман связывания» специфичен для неповрежденной ДНК и не мог бы вместить массивные аддукты. Таким образом, XPC прикрепляется только к неповрежденной нити ДНК. Такой характер связывания делает возможным для XPC связывать большое разнообразие структурно различных массивных повреждений [63].

NER, связанная с транскрипцией – TC-NER (transcription-coupled nucleotide excision repair). В этом случае поиск и удаление объемных повреждений осуществляется в транскрибируемых участках. Иницируется TC-NER остановкой РНК-полимеразы II перед поврежденным участком ДНК [25]. Затем белки CSA и CSB вытесняют РНК-полимеразу, освобождая место повреждения для белков NER [36]. Комплекс белков TFIIH способствует переключению с РНК-полимеразного комплекса (с РНК-полимеразой II) на комплекс NER. При этом транскрипционный аппарат не разрушается. После завершения репарации к цепи ДНК вновь присоединяются CSA и CSB и транскрипция РНК-полимеразным комплексом продолжается [110]. TC-NER активируют не только объемные повреждения, но и повреждения, которые обычно репарируются в процессе BER [16].

Независимо от способа распознавания повреждения и инициации репарации, процесс восстановления нативной структуры ДНК реализуется по одному механизму [30, 36]. К месту повреждения подходят 10 белков и объединяются в мультифункциональный транскрипционный фактор TFIIH (multi-functional transcription factor ). TFIIH состоит из 10 субъединиц. В образовавшемся комплексе можно выделить центральную часть (состоящую из XPB, p52, p8, p62, p34, p44) и циклинизируемый комплекс (CAK, состоит из CDK7, циклина H и MAT1), а также соединяющий их белок XPD [15.] CAK от TFIIH диссоциирует и непосредственно в NER не участвует [4, 14].

Затем, две ассоциированные с TFIIH АТФ-зависимые геликазы XPB и XPD раскручивают спираль ДНК и образуют «пузырь» длиной примерно в 30 нуклеотидов по обеим сторонам от повреждения [25, 36, 107].

В исследованиях на археях, имеющих свой аналог XPB, было установлено, что этот белок обеспечивает прикрепление комплекса TFIIH к ДНК, а также обладает важной для процесса NER АТФазной активностью. В процессе прикрепления к ДНК белок претерпевает значительные структурные изменения [21]. Как XPB, так и XPD являются каталитическими ферментами, служащими движущей силой всего TFIIH в NER.

Роль остальных субъединиц также постепенно начинает проявляться. Показано, что p52 стимулирует активность XPB, а p44 тесно взаимодействует с XPD и также стимулирует его деятельность [13]. Неожиданно важной оказалась роль p8, самой маленькой из субъединиц. В её отсутствие нарушается разделение двойной спирали ДНК и присоединение XPA [14].

Присоединением XPD завершается сборка первичного комплекса NER. Далее к участку повреждения независимо друг от друга присоединяются XPA, RPA и XPG, а XPC-HR23B на этом этапе от комплекса отделяется. Центральным элементом комплекса теперь служит XPA [31]. Этот белок взаимодействует практически со всеми остальными и его вероятная роль заключается в том, чтобы все части комплекса NER находились на своих местах к тому моменту, как будет произведён надрез.

Особенно тесно XPA сотрудничает с белком RPA, связывающим одонитевую ДНК и состоящим из трех субъединиц (RPA70, RPA32 и RPA14). Считается, что XPA и RPA совместно связываются с ДНК [94]. Оптимальный участок связывания ДНК для RPA состоит примерно из 30 нуклеотидов, то есть как раз такой, какой подвергается вырезанию при NER. Полагают, что RPA прикрепляется к неповреждённой нити ДНК, и тем самым помогает двум эндонуклеазам ERCC1-XPF и XPG разместиться на их субстрате – повреждённой нити ДНК. RPA играет важную роль в координации событий эксцизии и репаративного синтеза [84].

XPG играет в NER структурную и ферментативную функцию. Структурно-специфичная эндонуклеаза XPG присоединяется к TFIIH и, по-видимому, остаётся с ним связанной, по крайней мере, при исполнении некоторых из своих функций [40]. После завершения сборки комплекса XPG производит разрез ДНК с 3'-конца, после чего разрезает 5'-конец. С другой стороны, недавнее исследование предполагает, что первой разрез совершает как раз ERCC1-XPF, для чего ему требуется присутствие, но не активность XPG [20]. Это подтверждается сведениями о том, что репарационный синтез может начаться и пройти до половины длины заполняемого разрыва ещё до инцизии ДНК ферментом XPG [102].

Инцизия рестриктазой XPF оставляет свободную 3'-гидроксильную группу, от которой репликационный механизм может сразу начать репарационный синтез. Напротив, разрезание XPG оставляет после себя 5'-фосфат, который не может служить началом для синтеза и необходим только на этапе лигирования [34].

Комплекс из TFIIH, XPA, RPA и XPG относительно устойчив и эксцизия запускается только после присоединения ERCC1-XPF, которая рекрутируется белком XPA [83].

После вырезания повреждённого олигонуклеотида, он остаётся связанным с TFIIH. Затем TFIIH присоединяет АТФ, а от олигонуклеотида освобождается. Освободившийся олигонуклеотид связывается с RPA и впоследствии подвергается разложению [49].

На основании исследований *in vitro* считалось, что заполнение разрыва происходит с участием обычных факторов репликации: ДНК-полимераз  $\delta$  и  $\epsilon$ , скользящего «зажима» PCNA, пентамера RFC, который устанавливает «зажим» и RPA [4, 98]. Недавние исследования показали, что этот процесс на самом деле более сложен. Первой неожиданностью оказалось участие подверженной частым ошибкам ДНК-полимеразы  $\kappa$ . Предполагается, что она работает совместно с ДНК-полимеразой  $\delta$ . Совместно эти две полимеразы осуществляют приблизительно 50 % NER. Остальные 50 %, вероятно, производит ДНК-полимераза  $\epsilon$ . Для

того, чтобы принимать участие в NER, каждая из трёх ДНК-полимераз требует своих факторов-партнеров. Для активации полимеразы  $\delta$  необходимы RFC и PCNA. Для полимеразы  $\kappa$  – PCNA и XRCC1 (белок, участвующий в BER). Для полимеразы  $\epsilon$  – модифицированная форма RFC, содержащая Ctf18. Отличаются ли чем-либо функционально пути репарации с использованием различных ДНК-полимераз, пока неизвестно [81].

Механизм последней стадии процесса NER – лигирования разрыва, оставшегося после репарационного синтеза – зависит от пролиферационного статуса клетки. Первоначально считалось, что оно осуществляется только с помощью ДНК-лигазы I, но, как выяснилось, активное участие принимают также ДНК-лигаза III $\alpha$  и XRCC1. В клетках, находящихся в состоянии покоя, ДНК-лигаза III $\alpha$  и ДНК-полимераза  $\delta$  для NER абсолютно необходимы, а в реплицирующих клетках они также используются, тогда как ДНК-полимераза  $\epsilon$  и ДНК-лигаза I используются исключительно в реплицирующих клетках [75].

Как и при всех операциях, совершаемых над ДНК, при NER необходима поддержка белков, модифицирующих хроматин, для получения доступа к нужным участкам ДНК. В общем случае при этом требуется участие двух компонентов: модификатора хвостовых частей гистонов, чтобы уменьшить сродство гистонов к ДНК, и АТФ-зависимых ферментов, переформирующих хромосомы, чтобы иметь возможность перемещать гистоны вдоль ДНК [99]. Исследования показали, что, как и следовало ожидать, NER замедляется при полностью сформированных нуклеосомах, и может неспецифически усиливаться в присутствии перестраивающих хроматин ферментов класса SNF2/SFI2 [37].