

ЭКСЦИЗИОННАЯ РЕПАРАЦИЯ НУКЛЕОТИДОВ. МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ

Обзор

© 2023 А.А. Попов¹, И.О. Петрусева¹, Н.В. Науменко¹, О.И. Лаврик^{1,2*}

¹ Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,
630090 Новосибирск, Россия; электронная почта: lavrik@niboch.nsc.ru

² Новосибирский национальный исследовательский государственный университет,
630090 Новосибирск, Россия

Поступила в редакцию 29.03.2023

После доработки 30.08.2023

Принята к публикации 31.08.2023

Система эксцизионной репарации нуклеотидов (NER) ответственна за удаление из ДНК широкого набора объемных повреждений, что вносит существенный вклад в поддержание стабильности генома. Эффективность, с которой белки системы NER распознают и удаляют объемные повреждения, зависит от многих факторов и имеет важное клинко-диагностическое значение. В обзоре рассмотрены современные представления о молекулярных основах функционирования системы NER в клетках эукариот, а также проанализированы методы и подходы, которые применяются для определения эффективности функционирования данной системы репарации ДНК как *in vitro*, так и *ex vivo*.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: эксцизионная репарация нуклеотидов, повреждения ДНК, методы определения активности NER.

DOI: 10.31857/S0320972523110155, EDN: MMRCFF

ВВЕДЕНИЕ

Системы репарации ДНК — важная группа молекулярных механизмов клетки, действие которых обеспечивает поддержание стабильности генома [1]. Белки системы эксцизионной репарации нуклеотидов (Nucleotide Excision Repair, NER) удаляют из ДНК объемные повреждения — ковалентные аддукты различной природы, которые формируются, как правило, с гетероциклическими основаниями нуклеотидных звеньев под действием экзогенного стресса, а именно УФ-облучения и вредных соединений из окружающей среды. Эти повреждения вызывают значительные нарушения регулярной двухцепочечной структуры ДНК [1–3].

Эффективность удаления объемных повреждений из ДНК зависит от функционального состояния и активности системы NER в клетках. Одним из примеров наследственных синдромов, связанных с дефектами в работе NER у человека, является пигментная ксеродерма, от названия которой произошли обозначения целого ряда белков-участников NER (Xeroderma Pigmentosum complementation group (XP-белки) A, B, C, D, E, F, G) [2]. Пониженная активность NER наблюдается в клетках больных нейродегенеративными заболеваниями и ассоциирована со старением [3–5]. Данные об эффективности удаления репаративным аппаратом клетки индуцированных терапией объемных повреждений ДНК необходимы при разработке химиопрепаратов, действие которых основано

Принятые сокращения: CAT — хлорамфеникол ацетилтрансфераза; CPD — циклобутан-пиримидиновый димер; HCR — реактивация клеток-хозяев; NER — эксцизионная репарация нуклеотидов; GG-NER — общегеномная эксцизионная репарация нуклеотидов; TC-NER — эксцизионная репарация нуклеотидов, ассоциированная с транскрипцией; nAnt — N-[6-(9-антраценилкарбамоил)гексаноил]-3-амино-1,2-пропандиол; nFlu — N-[6-(5(6)-флуоресцеинилкарбамоил)гексаноил]-3-амино-1,2-пропандиол; TFIIH — фактор транскрипции IIH; XP-белки — Xeroderma Pigmentosum complementation group; ХРС — белок, участвующий в распознавании объемных аддуктов ДНК.

* Адресат для корреспонденции.

на способности формировать такие повреждения ДНК, поэтому рассматриваемая проблема имеет как фундаментальное, так и прикладное (клинико-диагностическое) значение.

Репаративный статус клетки в условиях генотоксического стресса может быть оценен по уровню транскрипции генов, связанных с репарацией ДНК, в том числе генов, кодирующих ключевые белки системы NER, а также по уровням экспрессии белков репарации ДНК [6, 7]. Однако серьезным ограничением при применении геномных, транскриптомных и протеомных подходов является то, что посттранскрипционная и посттрансляционная регуляция экспрессии и собственно активность функционирования белков системы NER не могут быть оценены с помощью этих методов. Кроме того, корреляция между уровнями транскрипции и активностью ферментов репарации часто оказывается незначительной [8]. В то же время измерение функциональной активности систем репарации ДНК является более адекватным способом оценки репаративного статуса клетки, то есть ее способности удалять повреждения и восстанавливать нативную структуру ДНК.

Целью данного обзора является рассмотрение ряда существующих методов определения эффективности функционирования системы NER, их преимуществ и недостатков. Первая часть обзора содержит краткое описание механизмов NER с указанием ссылок на недавно опубликованные обзоры [3, 9], которые посвящены детальному описанию этих механизмов. Во второй части рассматриваются методы определения эффективности функционирования NER, в том числе разработанные нами. Обзор актуален и может быть интересен для исследователей, изучающих NER, поскольку рассмотрение спектра применяемых методов определения активности этой системы репарации ДНК ранее не проводилось в других обзорах. Представленная в обзоре информация может быть полезна и применима не только при выборе подходящего для исследования метода определения активности NER, но и для совершенствования существующих, а также разработки новых эффективных подходов к оценке репаративного статуса клетки, необходимых для развития медицины.

СИСТЕМА ЭКСЦИЗИОННОЙ РЕПАРАЦИИ НУКЛЕОТИДОВ

В работе системы NER выделяют несколько последовательных этапов: 1) поиск и обнару-

жение участков ДНК, которые могут содержать повреждения; 2) проверка наличия объемного повреждения и сборка «предрасщепляющего» (предыницизионного) комплекса; 3) формирование готового «расщепляющего» (инцизионного) комплекса, удаление одноцепочечного фрагмента ДНК с повреждением и репаративный синтез ДНК в образованной бреши.

Существуют две ветви NER – общегеномная (Global Genome, GG-NER) и NER, ассоциированная с транскрипцией (Transcription-Coupled NER, TC-NER) [10]. В процессе GG-NER поиск и обнаружение участков ДНК, содержащих повреждение, осуществляет специализированный гетеротримерный комплекс XPC–RAD23B–CETN2, в котором роль сенсора, чувствительного к нарушениям регулярной двуцепочечной структуры ДНК, принадлежит белку XPC (белок, участвующий в распознавании объемных аддуктов ДНК) [11, 12]. Субъединица RAD23B (RADiation sensitivity abnormal protein 23 homolog B) защищает XPC от протеасомной деградации и обеспечивает стабильность всего комплекса, но не контактирует с поврежденной ДНК и высвобождается из комплекса при связывании XPC с ДНК [13–15]. Centrin 2 (CETN2) участвует в формировании и стабилизации гетеротримерного комплекса и, наряду с XPC, может взаимодействовать с ДНК [15–17].

При обнаружении поврежденного участка ДНК XPC располагается на неповрежденной цепи ДНК напротив повреждения, происходит перегиб углеводофосфатного остова ДНК с формированием угла 140° , при этом поврежденное основание выворачивается из дуплекса [18]. Для обнаружения белком XPC участков, содержащих УФ-повреждения, присутствие которых не приводит к заметному искажению регулярной структуры ДНК, требуется участие специализированного сенсорного белка – DDB2 (Damage specific DNA Binding protein 2), а также белков DDB1, PARP1 (Poly(ADP-ribose) Polymerase 1), CUL4a (Cullin 4a) и RBX1 (Ring-Box 1), работа которых делает УФ-повреждение «видимым» для XPC в контексте хроматина [19]. Формирование комплекса XPC–ДНК с характерной геометрией служит сигналом для привлечения к месту повреждения фактора транскрипции TFIIH (Transcription Factor IIH), который проводит проверку повреждения.

Инициация TC-NER происходит при блокировании продвижения РНК-полимеразы II объемным повреждением, находящимся в транскрибируемой цепи [20, 21]. С заблокированной повреждением РНК-полимеразой II связыва-

ется белок CSB (Cockayne Syndrome B), который изгибает углеводофосфатный остов молекулы ДНК на 80° и осуществляет попытку АТФ-зависимой транслокации РНК-полимеразы II через вызвавший ее остановку «барьер» [22–24]. Поскольку транслокация РНК-полимеразы II через объемное повреждение невозможна, CSB оттесняет РНК-полимеразу II и привлекает факторы репарации CSA (Cockayne Syndrome A) и UVSSA–USP7 (UV Stimulated Scaffold protein A; Ubiquitin Specific Peptidase 7). CSA связывается с комплексом белков CSB–РНК-полимераза II и осуществляет их убиквитинирование [25]. К сформированному комплексу CSA–CSB–РНК-полимераза II присоединяется гетеродимер UVSSA–USP7, с которым через р62-субъединицу взаимодействует фактор TFIIH, ответственный за следующую стадию узнавания повреждения.

Последующие стадии узнавания и удаления повреждения осуществляются комплексами белков, которые формируются одинаковым по составу для обеих ветвей NER набором ферментов и факторов. В состав фактора TFIIH входят две АТФ-зависимые хеликазы XPB и XPD, а также белки р8, р34, р44, р52, р62 и субкомплекс САК (CDK-Activating Kinase), выполняющие структурные и регуляторные функции [26]. При высвобождении САК-субкомплекса XPB связывается с неповрежденной цепью ДНК с 3'-стороны от повреждения и раскручивает ДНК примерно на 5 п.н. в направлении 3'→5' поврежденной цепи. Это позволяет XPD, выполняющей в NER роль верифицирующей хеликазы, связаться с поврежденной цепью ДНК с 5'-стороны от повреждения [27–29]. XPD продвигается по поврежденной цепи ДНК в направлении 5'→3', постепенно формируя асимметричный «пузырь» и останавливаясь при встрече с объемным аддуктом [27, 30]. В сформированный на ДНК фактором TFIIH комплекс вовлекаются белки RPA (Replication Protein A) и фактор пигментной ксеродермы А (ХРА), которые обеспечивают правильное расположение структурно специфичных эндонуклеаз XPG и XPF в комплексе с помогающим ее работе белком ERCC1 (Excision Repair Cross-Complementation group 1) на поврежденной ДНК и участвуют в формировании предынцизионного комплекса [31–34].

В присутствии XPG, связавшегося с поврежденной ДНК с 3'-стороны от повреждения, ERCC1–XPF вносит в ДНК разрыв с 5'-стороны от повреждения, затем высвобождается из комплекса. Появление в результате расщепления цепи ДНК свободной 3'-ОН-группы служит сигналом для инициации репаратив-

ного синтеза цепи ДНК, в котором участвуют белки репликации: ДНК-полимеразы δ или ε, репликативные факторы RPA и RFC (Replication Factor C), PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) [35]. В белковом комплексе, который связан с одноцепочечным ДНК-фрагментом с повреждением, происходят конформационные перестройки, в результате которых каталитический домен XPG активируется и вносит разрыв с 3'-стороны от повреждения [36, 37]; затем вместе с удаляемым ДНК-фрагментом, содержащим повреждение, высвобождаются ХРА, XPG и TFIIH [38]. Восстановление целостности вновь синтезированной цепи ДНК катализируют ДНК-лигазы (I или IIIα).

МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ СИСТЕМЫ ЭКСЦИЗИОННОЙ РЕПАРАЦИИ НУКЛЕОТИДОВ

Широкая специфичность, большое количество белков-участников, многоэтапный механизм процесса, а также существование двух ветвей эукариотической системы NER определяют разнообразие применяемых подходов оценки эффективности функционирования этой системы репарации и используемых для этого модельных белковых систем и ДНК-субстратов.

Модельные белковые системы и ДНК-субстраты. Использование модельных систем различной степени сложности, в том числе реконструированных из предварительно очищенных, как правило, рекомбинантных белков, позволило выяснить многие детали механизма репарации объемных повреждений в клетках эукариот [39–41], а также сравнить субстратные свойства ДНК, содержащих повреждения различной структуры [34]. Наиболее часто измеряется активность эндогенных белков NER, содержащихся во фракционированных по стандартной методике цельноклеточных экстрактах (NER-компетентных экстрактах) млекопитающих [42].

Агенты, повреждающие ДНК, часто генерируют гетерогенные смеси повреждений, однако для сравнительной оценки репаративного статуса клеток и определения эффективности удаления повреждений конкретного типа нужны ДНК-субстраты с определенной структурой. Модельные ДНК, которые используются для определения эффективности функционирования системы NER *in vitro* и *ex vivo*, представляют собой протяженные линейные

ДНК-дуплексы и плазмидные ДНК, содержащие в заданной позиции одной из цепей объемное повреждение [43–48]. Минимальная длина линейного ДНК-дуплекса, необходимая для протекания реакции специфической эксцизии, катализируемой белками NER, составляет 100 п.н. [48]. Значительная часть работ по определению эффективности функционирования NER *in vitro* была выполнена с использованием модельных кольцевых ДНК, содержащих циклобутан-пиримидиновый димер (CPD), пиримидин-пиримидон-(6–4)-фотопродукты и производные бенз[а]пирена [43, 49], а также ацетиламинофлуорена [50]. Основой для создания модельных ДНК могут быть полученные методом твердофазного синтеза олигодезоксирибонуклеотиды, содержащие модифицированное нуклеотидное звено. Такие фрагменты могут быть встроены в более протяженные структуры, включая кольцевые плазмидные ДНК, с помощью ферментативного лигирования либо при использовании в качестве праймера в катализируемой ДНК-полимеразой реакции и последующего лигирования [45, 48]. Возможно также введение в ДНК соответствующего дезоксинуклеозидмонофосфата с помощью ДНК-полимеразной и лигазной реакций [51, 52].

Эффективность удаления повреждений из ДНК зависит от многих факторов. Для линейных ДНК-дуплексов различной длины и линеаризованной плазмиды, которые содержали бенз[а]пиреновое производное дезоксигуанина, эффективность эксцизии не превышала 5–10%, в то время как эффективность эксцизии этого повреждения из той же плазмиды, находящейся в кольцевой форме, была в 6 раз выше [53]. Различия в эффективности удаления системой NER одного и того же аддукта из ДНК с одинаковым нуклеотидным контекстом могут быть обусловлены возможностью взаимодействия с линейными дцДНК белков PARP1 и комплекса Ku 70/80 с ДНК-зависимой протеинкиназой, которые присутствуют в клеточных экстрактах и обладают повышенным сродством к двухцепочечным концам, что обеспечивает их конкуренцию с белками NER [54]. Интересно, что эксцизия поврежденного участка, содержащего N-(дезоксигуанозин-8-ил)-2-ацетиламинофлуорен, при инкубации с белками NER-компетентного экстракта клеток HeLa наблюдалась только при использовании кольцевой ДНК [50]. В то же время эффективность удаления белками NER-компетентного экстракта клеток HeLa фрагментов, содержащих CPD, была практически одинаковой при использовании как

кольцевых, так и линейных ДНК [48]. На эффективность эксцизии влияет не только структура повреждения, но и нуклеотидная последовательность окружающего его участка ДНК, которая влияет на характер индуцируемых присутствием повреждения нарушений структуры ДНК [55]. Таким образом, выбор модельного повреждения и нуклеотидной последовательности ДНК является важнейшим этапом дизайна эксперимента с применением любого подхода для определения эффективности функционирования NER и до сих пор не является абсолютно тривиальной задачей.

Определение эксцизионной активности NER *in vitro*. Оценка специфической эксцизионной активности системы NER *in vitro* дает информацию об эффективности удаления из ДНК участка с повреждением и позволяет проводить сравнительные биохимические исследования, характеризующие как свойства белковых систем, так и свойства модельных ДНК [45, 56].

При прямой детекции продуктов эксцизии модельные ДНК содержат радиоактивную метку вблизи повреждения, в результате чего эту метку содержат и продукты эксцизии [57]. В процессе ферментативного синтеза протяженных ДНК для прямой детекции 5'-конец олигодезоксирибонуклеотидного фрагмента фосфорилируется с использованием [γ - 32 P]АТФ с удельной радиоактивностью 6000 Ки/ммоль. Это позволяет при невысоких уровнях эксцизии, которые часто наблюдаются *in vitro*, визуализировать продукты реакции эксцизии и оценить их количество. Однако необходимость использования больших количеств радиоактивной метки для синтеза субстратов, а также трудности, возникающие при хранении высокорadioактивных протяженных ДНК, значительно ограничивают применение этого метода. Недавно был разработан аналог данного метода, не требующий использования радиоактивной метки. В этом случае образовавшиеся продукты эксцизии (олигодезоксирибонуклеотидов длиной ~20–30 нуклеотидов) извлекали из лизата предварительно облученных УФ-светом клеток путем включения в 3'-конец биотина и последующей конъюгации со стрептавидином, с которым ковалентно связана пероксидаза хрена, необходимая для хемилюминесцентной визуализации [58]. Ограничение предложенного подхода заключается в быстрой деградации образующихся продуктов эксцизии, что приводит к значительному снижению сигнала.

Метод оценки эффективности удаления объемных повреждений белками NER *in vitro*

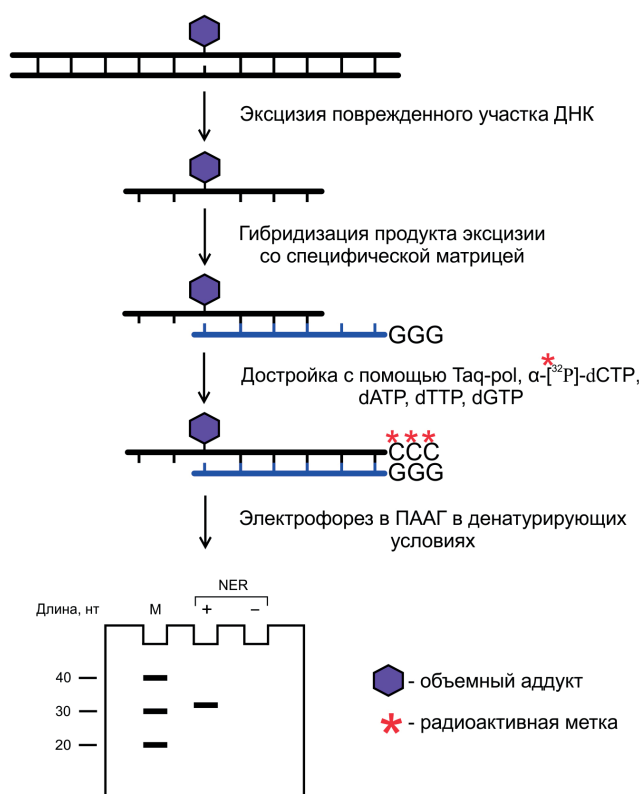


Рис. 1. Оценка эксцизионной активности NER *in vitro* путем постэксцизионного мечения продуктов реакции эксцизии, адаптирован из [56]

основан на постэксцизионном радиоактивном мечении 3'-концов продуктов специфической эксцизии в процессе их достройки ДНК-полимеразой (например, Taq-полимеразой). В качестве матрицы используется олигонуклеотид, последовательность которого частично комплементарна вырезаемому фрагменту с повреждением (рис. 1). Оптимизированная структура матрицы обеспечивает высокий уровень включения радиоактивно-меченных нуклеотидов, что существенно снижает расход радиоактивной метки, а также исключает возможность достройки самой матрицы. Метод позволяет сравнивать как эксцизионную активность образцов, содержащих белки NER, так и субстратные свойства ДНК с разными по структуре повреждениями [45, 52].

Использование данного метода в сочетании с ДНК-субстратами, которые содержали синтетические объемные повреждения, позволило существенно продвинуться в понимании влияния структуры повреждения на различные стадии репарационного процесса [40, 52, 59], а также оценить эксцизионную активность белков NER в отношении линейных ДНК-дуплексов, содержащих кластерные повреждения в различных положениях цепи,

и характер ее изменения в кластерах различной структуры и состава, что позволило углубить понимание взаимосвязи структуры ряда повреждений с эффективностью формирования продуктивных комплексов на первом этапе их узнавания белком ХРС [52, 59]. Кроме того, выполненный с использованием данного метода сравнительный анализ репарационного статуса клеток показал, что белки клеточных экстрактов долгоживущего голого землекопа (*Heterocephalus glaber*) более эффективно распознают и удаляют из ДНК объемные повреждения, чем белки экстрактов, полученных из клеток мыши (*Mus musculus*) [56]. Полученный результат является одним из немногих экспериментальных подтверждений взаимосвязи эффективно функционирующих систем репарации ДНК с долголетием.

Оценка эффективности функционирования NER методом количественной PCR. Главным преимуществом подходов, использующих количественную PCR (quantitative Polymerase Chain Reaction, qPCR), является возможность оценки эффективности репарации повреждений при минимальных количествах ДНК-матрицы. Принцип определения активности NER с помощью qPCR основан на разнице в эффективности копирования неповрежденной модельной ДНК и ДНК того же размера и последовательности, содержащей в одной из цепей объемное повреждение, способное блокировать удлинение праймера ДНК-полимеразой. В результате репарации структура ДНК-матрицы восстанавливается, что обеспечивает полноценное удлинение обоих праймеров и эффективное копирование ДНК-матрицы в ходе PCR [60]. Эффективность репарации определяется по разнице в получаемых в ходе PCR значениях порогового цикла $C(t)$ между восстановленной ДНК и контрольной неповрежденной ДНК (так называемая $dC(t)$). Уменьшение значения $dC(t)$ говорит о протекании репарации и позволяет определить концентрацию (количество) восстановленной (прошедшей полный цикл репарации) ДНК в реакционной смеси после проведения реакции NER (рис. 2).

Одной из главных методических проблем применения PCR для оценки эффективности удаления объемных повреждений является то, что в результате достройки праймера на неповрежденной цепи ДНК-матрицы, содержащей объемное повреждение, в первом цикле реакции образуется укороченная копия поврежденной цепи ДНК, дальнейшая амплификация которой происходить не будет. В то же время полноразмерный продукт копирования

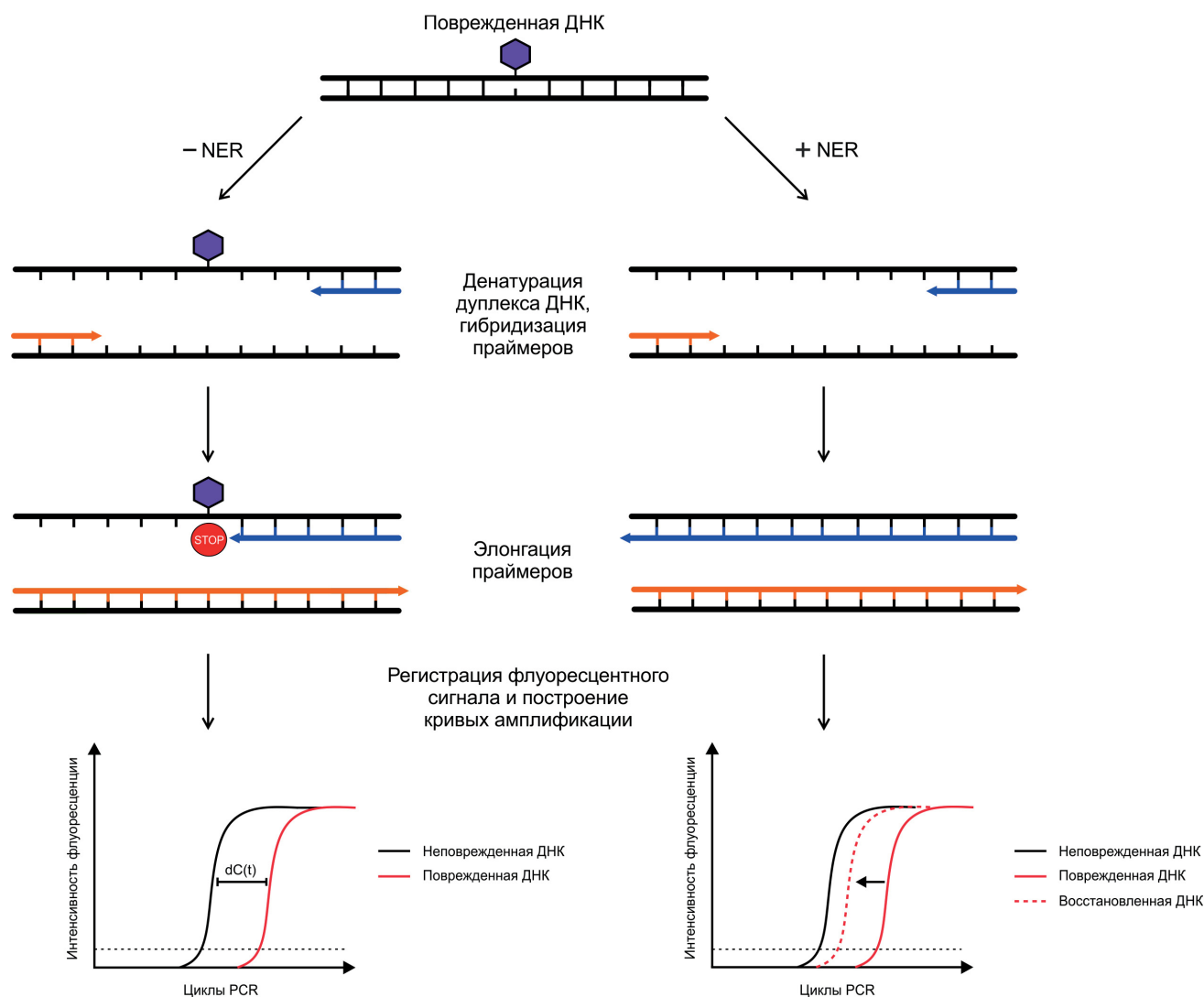


Рис. 2. Схематическое изображение способа оценки эффективности удаления объемных повреждений белками NER с помощью qPCR

неповрежденной цепи, также образующийся при протекании первого цикла ДНК-полимеразной реакции, будет амплифицироваться. Это приведет к уменьшению диапазона возможных значений $dC(t)$ до одного цикла. В работе Chesner и Campbell [61] предложен вариант методики оценки эффективности удаления объемных повреждений с использованием qPCR, который позволил обойти эту проблему и тем самым расширить диапазон возможных значений $dC(t)$ до трех циклов. Авторы данной работы использовали прием предварительной многократной элонгации праймера 1. Полноразмерный продукт элонгации образуется, только если поврежденная цепь плазмиды была восстановлена в ходе репарации, поскольку присутствие объемного повреждения в цепи блокирует элонгацию праймера 1, комплементарного находящемуся с 3'-стороны от повреждения участку пов-

режденной цепи плазмидной ДНК. Клетки млекопитающих трансфицировали плазмидной ДНК, содержащей ДНК-белковую сшивку либо холестеринавый аддукт, и некоторое время культивировали. Затем плазмидную ДНК выделяли из клеток и использовали в качестве матрицы для PCR. После многократного повторения циклов удлинения праймера 1 в реакционную смесь добавляли праймер 2, комплементарный второй цепи, и проводили qPCR. Эффективность репарации объемного повреждения рассчитывали на основе разницы значений порогового цикла $C(t)$ контрольной неповрежденной и процессированной в ходе репарации плазмид. С использованием такого подхода было показано, что репарация плазмидной ДНК, содержащей ДНК-белковую сшивку, проходит в 3 раза более эффективно в клетках человека, чем в клетках китайского хомячка (СНО), тогда как значимых различий

в эффективности репарации плазмидной ДНК, содержащей холестерин-аддукт, в сравниваемых клетках выявлено не было [61].

Предложенный в работе Shen et al. [62] подход, основанный на использовании 5'-биотинилированного CPD-содержащего ДНК-дуплекса шпильчатой структуры в качестве субстрата, позволил оценить эффективность работы NER в различных типах клеток человека. Трансфицированные CPD-содержащей ДНК клетки после культивирования подвергали лизису, из лизата извлекали целевую ДНК и с использованием qPCR проводили оценку эффективности ее репарации. Спустя 24 часа после трансфекции эффективность репарации CPD-содержащей ДНК системой NER клеток линии HEK 293T составила 43,7%, тогда как в случае клеток линии SW480 этот показатель не превышал 1% [62].

Применение qPCR позволяет оценивать количество объемных повреждений, возникающих в ДНК в результате различных генотоксических воздействий, включая химиотерапию, а также длительность сохранения индуцированных повреждений в ДНК клеток живого организма [63, 64]. В работе Kalinowski et al. [65] проведено сравнение количества повреждений, образуемых воздействием УФ-света и цисплатина на митохондриальную и геномную ДНК. Согласно данным, полученным в этой работе, количество УФ-повреждений во фрагменте митохондриальной ДНК мышечных клеток линии L1210 было в 1,5 раза выше, чем во фрагменте геномной ДНК, в то время как при обработке цисплатином количество образуемых внутрипочечных сшивок в митохондриальной ДНК оказалось в 2,5 раза ниже, чем в геномном фрагменте.

Использование и дальнейшее развитие методов определения эффективности функционирования NER с помощью qPCR имеет важное прикладное значение. Высокая чувствительность этого метода в сочетании с несложной процедурой проведения эксперимента открывает перспективы к использованию qPCR-анализа для диагностики нарушений работы системы NER и оперативной оценки репаративного статуса больных тяжелыми нейродегенеративными и раковыми заболеваниями.

Применение метода ДНК-комет для оценки эффективности функционирования NER *ex vivo*. В качестве субстрата при оценке уровня образования разрывов в ДНК методом ДНК-комет используются нуклеотидные структуры (сверхскрученная ДНК, прикрепленная к ядерному матриксу) отдельных клеток. Исследуемые

клетки обрабатывают повреждающим агентом, затем помещают в гель из легкоплавкой агарозы, приготовленный на предметном стекле для микроскопии, и лизируют, чтобы удалить мембрану и растворимые клеточные компоненты [66]. ДНК, прикрепленную к ядерному матриксу, подвергают щелочной обработке и анализируют методом электрофореза в щелочных условиях с окраской интеркалирующим флуоресцентным красителем. При движении в электрическом поле нуклеотид принимает вид «комет» с лидирующей при движении в геле «головой», сформированной сверхскрученной ДНК, и характерным отстающим «хвостом», представляющим собой фрагменты ДНК с одноцепочечными разрывами (релаксированные формы) [66, 67]. Оценка степени повреждения ДНК ведут с помощью специализированного программного обеспечения (рис. 3).

Несмотря на свою популярность, первый вариант метода ДНК-комет, разработанный в основном для анализа генотоксичности лекарственных препаратов и загрязнителей окружающей среды, имел ряд недостатков. Проведение экспериментов с применением данного метода было продолжительным по времени и трудоемким, а также не давало возможности одновременного анализа большого числа образцов. Впоследствии развитие данного метода позволило обойти некоторые ограничения, связанные с продолжительностью эксперимента и его стоимостью, что позволило адаптировать его для высокопроизводительного скрининга [68].

Поскольку разрывы в ДНК могут возникать не только при генотоксическом воздействии, но и в процессе удаления повреждений, это позволяет использовать метод ДНК-комет для изучения систем репарации ДНК, в том числе и системы NER [69–72]. Однако селективная оценка количества разрывов, формируемых при процессинге объемного повреждения, в данном случае была бы невозможна. Более избирательная, хотя и косвенная, оценка эффективности репарации повреждений стала возможной после разработки метода ДНК-комет с применением ингибиторов. В работе Cipollini et al. [73] было показано, что воздействие УФ-света на лимфоциты человека приводит к значительному увеличению интенсивности флуоресценции мигрирующего «хвоста» нуклеотида через 20–90 минут после облучения. Спустя 120–240 минут после облучения интенсивность флуоресценции падает, что сигнализирует о восстановлении целостности ДНК. Обработка лимфоцитов человека новобиоцином — ингибитором, блокирующим

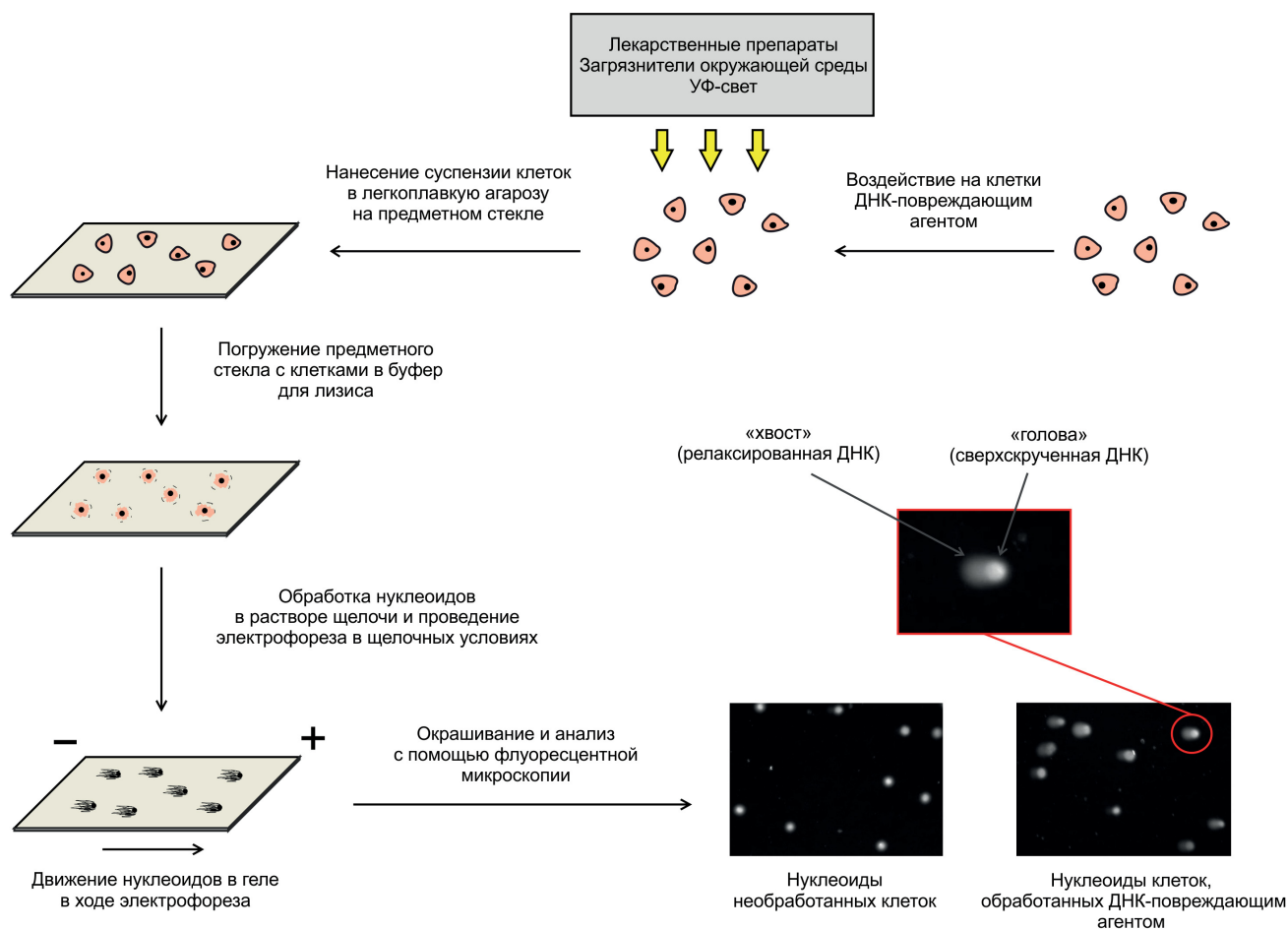


Рис. 3. Схема проведения эксперимента по оценке степени повреждения ДНК в клетке методом ДНК-комет

образование разрывов в ДНК, — приводила к снижению количества ДНК во фракции, формирующей «хвост» кометы. Присутствие афидиколина — ингибитора ДНК-полимеразы — блокировало репаративный синтез, в результате чего количество мигрирующей ДНК не менялось со временем. Таким образом, применение модифицированного метода ДНК-комет позволяет следить за двумя процессами: интенсивностью образования в ДНК разрывов и эффективностью репаративного синтеза [73]. Проведенная с использованием данного варианта метода сравнительная оценка уровня активности NER в человеческих фибробластах дикого типа и ХРА^{-/-}-фибробластах подтвердила его применимость для таких оценок. Эффективность репарации индуцируемых процессингом бенз[а]пиреновых аддуктов одноцепочечных разрывов в клетках дикого типа была выше, чем в ХРА^{-/-}-клетках. Было также показано, что количество одноцепочечных разрывов, образующихся при воздействии бенз[а]пирен-диол-эпоксида на дефектные клетки, было в 1,3 раза больше, чем в клетках дикого типа. Можно заключить, что

такая модификация метода ДНК-комет позволила повысить специфичность измерения эксцизионной активности системы NER [74].

Анализ ДНК-комет концептуально прост и является ценным дополнительным подходом к оценке репаративного статуса, однако трудоемок и малопроизводителен; существуют также проблемы с воспроизводимостью результатов. К настоящему времени разработаны усовершенствованные варианты комет-анализа, которые значительно увеличивают производительность, воспроизводимость и специфичность оценки эффективности репарации определенных классов повреждений ДНК с использованием различных ферментов репарации ДНК [75–77]. Однако даже в усовершенствованном виде комет-анализ обычно детектирует репарацию различных повреждений ДНК и требует нескольких этапов обработки образцов, для того чтобы выявить повреждения, специфичные для каждого из путей [78].

Метод оценки эффективности функционирования NER *ex vivo* путем реактивации экспрессии белков-репортеров в клетках хозяина. В настоящее время востребованным является

метод определения эффективности функционирования системы NER, основанный на реактивации экспрессии гена того или иного репортерного белка в клетках хозяина (Host Cell Reactivation, HCR). С использованием данного подхода можно проводить оценку активности NER в культуре клеток (*ex vivo*). Для этого в качестве субстрата используется плазмидная ДНК, содержащая объемное повреждение, которое блокирует экспрессию гена репортерного белка в исследуемых клетках [79]. Внедрение плазмиды в клетку происходит путем трансфекции или электропорации. Способ оценки уровня восстановления экспрессии репортерного белка определяется его свойствами.

С применением метода HCR была оценена эффективность репарации системой NER лимфоцитов человека плазмидных ДНК, содержащих УФ-повреждение, либо бенз[а]пиреновый аддукт в области промотора гена хлорамфеникол-ацетилтрансферазы (Chloramphenicol Acetyltransferase, CAT) [79]. Лимфоциты человека с нормальным фенотипом и лимфоциты, дефектные по генам различных ХР-белков, трансфицировали плазмидой. Доказательством восстановления экспрессии белка служило восстановление ацетилирования хлорамфеникола в присутствии радиоактивно меченного субстрата CAT, [³H]ацетил-КоА. По кинетике накопления [³H]ацетилхлорамфеникола судили об эффективности удаления объемного повреждения, блокирующего экспрессию CAT. Это исследование показало, что эффективность репарации ДНК в ХР-дефектных клетках была в 10–20 раз ниже, чем в нормальных [79]. Ранее применение метода HCR позволило также показать, что репарация плазмидных ДНК, содержащих индуцируемые воздействием цисплатина межцепочечные сшивки ДНК, в дефектных по ХР-генам клетках человека происходит значительно менее эффективно, чем в клетках дикого типа, что свидетельствует об участии белков NER в репарации одного из самых токсичных повреждений ДНК [80].

В качестве репортерных чаще используются флуоресцентные белки либо ферменты люцифераза и β-галактозидаза, применение которых позволило упростить детекцию репарации. Исследование репарации плазмидных ДНК, кодирующих ген репортерного белка люциферазы (*luc*) и содержащих УФ-повреждение в промоторном участке, в нормальных и ХР-дефектных клетках продемонстрировало возможность применения этого метода для сравнения репаративного статуса разных клеток [81]. С использованием плазмиды, со-

державшей ген флуоресцентного белка GFP, удалось провести количественную оценку эффективности репарации УФ-повреждений в клетках HEK 293. Было показано, что система NER клеток HEK 293 способна провести полную репарацию плазмидной ДНК, содержащей 1,4 УФ-повреждения на каждые 1000 нуклеотидов, в течение 12 часов после трансфекции [82].

Сравнительная оценка эффективности репарации плазмиды pEGFP-N1, предварительно подвергшейся облучению УФ-светом, в различных типах клеток человека была проведена также с применением активируемой флуоресценцией сортировки клеток (Fluorescent Activated Cell Sorting, FACS). Репарация модельной плазмиды в кератиноцитах происходила более эффективно, чем в фибробластах, а наименьшая эффективность репарации была отмечена в меланоцитах [83]. Комбинация методов HCR и FACS позволила определить роль GG-NER и TC-NER в репарации апуриновых/апиримидиновых сайтов (AP-сайтов) в клетках MRC-5 [84]. Было показано, что эффективность репарации плазмиды pEGFP-Q205, содержащей в качестве повреждения тиотетрагидрофуран (S-THF) — труднорепазируемый белками эксцизионной репарации оснований (Base Excision Repair, BER) аналог AP-сайта, содержащий фосфотиоатную группу, — снижалась в 2 раза при отсутствии функционально активной TC-NER и в 4 раза — при отсутствии функционально активной GG-NER. Полученные результаты позволили рассматривать GG-NER как преобладающий механизм репарации таких повреждений [84].

Недавно был предложен вариант метода определения эффективности функционирования NER *ex vivo* с использованием рекомбинантной плазмидной ДНК, несущей ген флуоресцентного белка TagRFP, и полученных на ее основе ДНК с объемными повреждениями [85]. Блокирующие экспрессию гена флуоресцентного белка синтетические объемные повреждения в этом случае вводятся в транскрибируемую цепь ДНК в область промотора гена *tagrfp*. Плазмидой с повреждением либо контрольной плазмидой трансфицируют исследуемые клетки, затем, инкубируя клетки в соответствующих условиях, с помощью флуоресцентной микроскопии следят за изменением уровня экспрессии TagRFP (рис. 4).

Поскольку присутствие объемного повреждения в транскрибируемой цепи в области промотора блокирует транскрипцию гена *tagrfp*, флуоресцентный сигнал в клетках, трансфицированных плазмидой с повреждением,

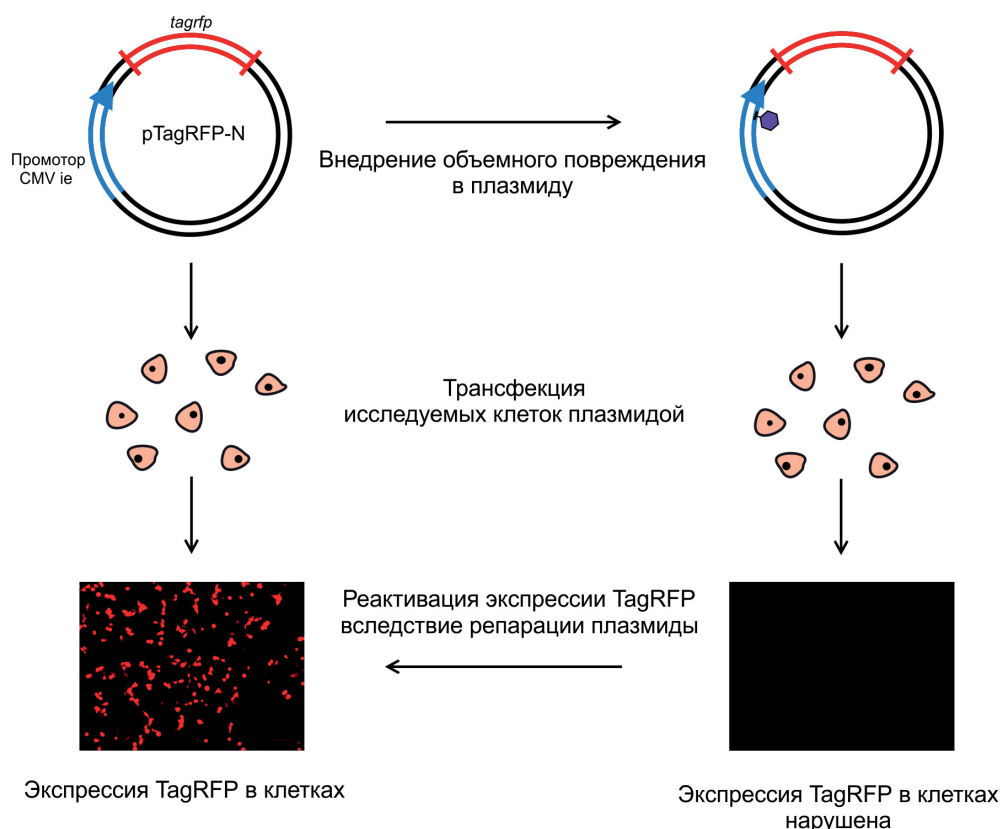


Рис. 4. Схематическое изображение способа определения эффективности функционирования NER *ex vivo*, основанного на реактивации экспрессии гена репортерного флуоресцентного белка в клетках хозяина. Адаптирован из [85]

не регистрируется. При удалении объемного повреждения происходит восстановление экспрессии TagRFP и появляется флуоресцентный сигнал.

Была проведена сравнительная оценка эффективности репарации плазмидных ДНК, содержащих синтетические объемные повреждения N-[2-[N-(4-азидо-2,5-дифторо-3-хлорпиридин-6-ил)-3-аминопропионил]аминоэтил], N-[6-(5(6)-флуоресцеинилкарбамоил)гексаноил]-3-амино-1,2-пропандиол (nFlu) и N-[6-(9-антраценилкарбамоил)гексаноил]-3-амино-1,2-пропандиол (nAnt), системой NER клеток HEK 293T. Появление флуоресцирующих клеток HEK 293T, трансфицированных nAnt-содержащей плазмидой, наступало спустя 10 часов после трансфекции, в то время как в случае клеток, трансфицированных плазмидой с nFlu, это время составило 8 часов. Таким образом, репарация плазмидной ДНК, содержащей nFlu, системой NER клеток HEK 293T проходила быстрее, чем репарация плазмидной ДНК, содержащей повреждение nAnt [85]. Ранее были исследованы субстратные свойства ДНК, содержащих эти объемные повреждения, в реакции специфической эксцизии, катализируемой белками NER-компетентных экстрактов, их влияние на структуру прилежа-

щей ДНК, а также эффективность их взаимодействия с XPD на этапе верификации [40, 45, 86]. Эффективность этапа первичного узнавания поврежденного участка, выраженная в уровне сродства XPC–ДНК, и эффективность специфической эксцизии nFlu и nAnt были практически одинаковы. Согласно данным моделирования, присутствие nFlu, в отличие от nAnt, не обеспечивало уровень дестабилизации ДНК-дуплекса, который был бы достаточен для формирования продуктивных для реакции NER комплексов XPC–ДНК [86]. Размер и расположение nFlu относительно повреждения допускали формирование как продуктивных, так и непродуктивных для NER комплексов. Однако сродство XPD к nFlu–ДНК было в 60 раз выше, чем сродство XPD к nAnt–ДНК [40]. Это, вероятно, увеличивало эффективность процессирования nFlu–ДНК и приводило к выравниванию уровня специфической эксцизии этих повреждений в процессе GG-NER.

Основанные на HCR подходы позволяют без использования радиоактивных меток оценивать в клетках эффективность процесса репарации в целом. Их развитие и применение позволит проводить мониторинг генотоксического воздействия лекарственных препаратов,

а также оценивать эффективность удаления не только объемных повреждений, но и повреждений, удаляемых белками системы BER [87, 88].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Эффективная репарация ДНК рассматривается как один из факторов, определяющих высокую продолжительность жизни и устойчивость млекопитающих к онкологическим и нейродегенеративным заболеваниям [7, 89]. Широкая субстратная специфичность системы NER, большое количество белковых факторов и ферментов, разветвленный и многоэтапный механизм делают оценку эффективности функционирования этой системы достаточно сложной задачей. Проведение сравнительных исследований эффективности протекания NER в клетках долгоживущих и короткоживущих млекопитающих, а также в нормальных и раковых клетках поможет продвинуться в понимании молекулярных основ клеточного старения и онкоустойчивости. Разработка усовершенствованных методов оценки эффективности функционирования NER,

основанных на знании деталей механизма данного процесса, позволит с применением разных модельных систем провести исследования, которые обеспечат прогресс в оценке персонального репаративного статуса, а также мониторинга и прогнозирования эффектов химиотерапевтического воздействия при проведении противоопухолевой терапии.

Вклад авторов. А.А. Попов, И.О. Петрусева, Н.В. Наumenko — написание текста статьи, О.И. Лаврик — редактирование текста статьи, Н.В. Наumenko, А.А. Попов — графическое оформление статьи, И.О. Петрусева, О.И. Лаврик — руководство работой.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 19-74-10056-П) и Проекта государственного задания ИХБФМ СО РАН (№ 121031300041-4, глава «Система эксцизионной репарации нуклеотидов»).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Chatterjee, N., and Walker, G. C. (2017) Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis, *Environ. Mol. Mutagen.*, **58**, 235-263, doi: 10.1002/em.22087.
2. Martens, M. C., Emmert, S., and Boeckmann, L. (2021) Xeroderma pigmentosum: gene variants and splice variants, *Genes*, **12**, 1173, doi: 10.3390/genes12081173.
3. Krasikova, Y., Rechkunova, N., and Lavrik, O. (2021) Nucleotide excision repair: from molecular defects to neurological abnormalities, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 6220, doi: 10.3390/ijms22126220.
4. Paccosi, E., Balajee, A. S., and Proietti-De-Santis, L. (2022) A matter of delicate balance: loss and gain of Cockayne syndrome proteins in premature aging and cancer, *Front. Aging*, **3**, 960662, doi: 10.3389/fragi.2022.960662.
5. Ataabadi, E. A., Golshiri, K., Van Der Linden, J., De Boer, M., Duncker, D. J., Jüttner, A., De Vries, R., Van Veghel, R., Van Der Pluijm, I., Dutheil, S., Chalgeri, S., Zhang, L., Lin, A., Davis, R. E., Gretchen, S. L., Danser, J. H. A., and Roks, A. J. M. (2021) Vascular ageing features caused by selective DNA damage in smooth muscle cell, *Oxid. Med. Cell Longev.*, **2021**, 2308317, doi: 10.1155/2021/2308317.
6. Christmann, M., and Kaina, B. (2013) Transcriptional regulation of human DNA repair genes following genotoxic stress: trigger mechanisms, inducible responses and genotoxic adaptation, *Nucleic Acids Res.*, **41**, 8403-8420, doi: 10.1093/nar/gkt635.
7. MacRae, S. L., Croken, M. M., Calder, R. B., Aliper, A., Milholland, B., White, R. R., Zhavoronkov, A., Gladyshev, V. N., Seluanov, A., Gorbunova, V., Zhang, Z. D., and Vijg, J. (2015) DNA repair in species with extreme lifespan differences, *Aging (Albany NY)*, **7**, 1171-1184, doi: 10.18632/aging.100866.
8. Figueroa-Gonzalez, G., and Perez-Plasencia, C. (2017) Strategies for the evaluation of DNA damage and repair mechanisms in cancer, *Oncol. Lett.*, **13**, 3982-3988, doi: 10.3892/ol.2017.6002.
9. Van den Heuvel, D., van der Weegen, Y., Boer, D. E. C., Ogi, T., and Luijsterburg, M. S. (2021) Transcription-coupled DNA repair: from mechanism to human disorder, *Trends Cell Biol.*, **31**, 359-371, doi: 10.1016/j.tcb.2021.02.007.
10. Kobaisi, F., Fayyad, N., Rezvani, H. R., Fayyad-Kazan, M., Sulpice, E., Badran, B., Fayyad-Kazan, H., Gidrol, X., and Rachidi, W. (2019) Signaling pathways, chemical and biological modulators of nucleotide excision repair: the faithful shield against

- UV genotoxicity, *Oxid. Med. Cell. Longev.*, **2019**, 4654206, doi: 10.1155/2019/4654206.
11. Le, J., and Min, J. H. (2023) Structural modeling and analyses of genetic variations in the human XPC nucleotide excision repair protein, *J. Biomol. Struct. Dyn.*, 1-28, doi: 10.1080/07391102.2023.2177349.
 12. Zebian, A., Shaito, A., Mazurier, F., Rezvani, H. R., and Zibara, K. (2019) XPC beyond nucleotide excision repair and skin cancers, *Mutat. Res. Rev. Mutat. Res.*, **782**, 108286, doi: 10.1016/j.mrrev.2019.108286.
 13. Yokoi, M., and Hanaoka, F. (2017) Two mammalian homologs of yeast Rad23, HR23A and HR23B, as multifunctional proteins, *Gene*, **597**, 1-9, doi: 10.1016/j.gene.2016.10.027.
 14. Grønbaek-Thygesen, M., Kampmeyer, C., Hofmann, K., and Hartmann-Petersen, R. (2023) The moonlighting of RAD23 in DNA repair and protein degradation, *Biochim. Biophys. Acta Gene Regul. Mech.*, **1866**, 194925, doi: 10.1016/j.bbagr.2023.194925.
 15. Rechkunova, N. I., Krasikova, Y. S., and Lavrik, O. I. (2021) Interactome of base and nucleotide excision DNA repair systems, *Mol. Biol. (Moscow)*, **55**, 155-166, doi: 10.1134/S0026893321020126.
 16. Feltes, B. C. (2021) Every protagonist has a sidekick: structural aspects of human xeroderma pigmentosum-binding proteins in nucleotide excision repair, *Protein Sci.*, **30**, 2187-2205, doi: 10.1002/pro.4173.
 17. Zhang, W., Shi, E., Zhao, Y., and Yang, B. (2018) Modulation effect of double strand DNA on the self-assembly of N-terminal domain of *Euplotes octocarinatus* centrin, *J. Inorg. Biochem.*, **180**, 15-25, doi: 10.1016/j.jinorgbio.2017.12.001.
 18. Paul, D., Mu, H., Zhao, H., Ouerfelli, O., Jeffrey, P. D., Broyde, S., and Min, J. H. (2019) Structure and mechanism of pyrimidine-pyrimidone (6-4) photoproduct recognition by the Rad4/XPC nucleotide excision repair complex, *Nucleic Acids Res.*, **47**, 6015-6028, doi: 10.1093/nar/gkz359.
 19. Apelt, K., Lans, H., Schäfer, O. D., and Luijsterburg, M. S. (2021) Nucleotide excision repair leaves a mark on chromatin: DNA damage detection in nucleosomes, *Cell. Mol. Life Sci.*, **78**, 7925-7942, doi: 10.1007/s00018-021-03984-7.
 20. Boetefuer, E. L., Lake, R. J., and Fan, H. Y. (2018) Mechanistic insights into the regulation of transcription and transcription-coupled DNA repair by Cockayne syndrome protein B, *Nucleic Acids Res.*, **46**, 7471-7479, doi: 10.1093/nar/gky660.
 21. Lans, H., Hoeijmakers, J. H. J., Vermeulen, W., and Marteijn, J. A. (2019) The DNA damage response to transcription stress, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **20**, 766-784, doi: 10.1038/s41580-019-0169-4.
 22. Van der Weegen, Y., Golan-Berman, H., Mevissen, T. E. T., Apelt, K., González-Prieto, R., Goedhart, J., Heilbrun, E. E., Vertegaal, A. C. O., van den Heuvel, D., Walter, J. C., Adar, S., and Luijsterburg, M. S. (2020) The cooperative action of CSB, CSA, and UVSSA target TFIIH to DNA damage-stalled RNA polymerase II, *Nat. Commun.*, **11**, 2104, doi: 10.1038/s41467-020-15903-8.
 23. Xu, J., Lahiri, I., Wang, W., Wier, A., Cianfrocco, M. A., Chong, J., Hare, A. A., Dervan, P. B., DiMaio, F., Leschziner, A. E., and Wang, D. (2017) Structural basis for eukaryotic transcription-coupled DNA repair initiation, *Nature*, **551**, 653-657, doi: 10.1038/nature24658.
 24. Kokic, G., Wagner, F. R., Chernev, A., Urlaub, H., and Cramer, P. (2021) Structural basis of human transcription-DNA repair coupling, *Nature*, **598**, 368-372, doi: 10.1038/s41586-021-03906-4.
 25. Fischer, E. S., Scrima, A., Böhm, K., Matsumoto, S., Lingaraju, G. M., Faty, M., Yasuda, T., Cavadini, S., Wakasugi, M., Hanaoka, F., Iwai, S., Gut, H., Sugawara, K., and Thomä, N. H. (2011) The molecular basis of CRL4DDB2/CSA ubiquitin ligase architecture, targeting, and activation, *Cell*, **147**, 1024-1039, doi: 10.1016/j.cell.2011.10.035.
 26. Kim, J., Li, C. L., Chen, X., Cui, Y., Golebiowski, F. M., Wang, H., Hanaoka, F., Sugawara, K., and Yang, W. (2023) Lesion recognition by XPC, TFIIH and XPA in DNA excision repair, *Nature*, **617**, 170-175, doi: 10.1038/s41586-023-05959-z.
 27. Kuper, J., and Kisker, C. (2021) Three targets in one complex: A molecular perspective of TFIIH in cancer therapy, *DNA Repair (Amst)*, **105**, 103143, doi: 10.1016/j.dnarep.2021.103143.
 28. Tsutakawa, S. E., Tsai, C. L., Yan, C., Bralić, A., Chazin, W. J., Hamdan, S. M., Schäfer, O. D., Ivanov, I., and Tainer, J. A. (2020) Envisioning how the prototypic molecular machine TFIIH functions in transcription initiation and DNA repair, *DNA Repair (Amst)*, **96**, 102972, doi: 10.1016/j.dnarep.2020.102972.
 29. Greber, B. J., Toso, D. B., Fang, J., and Nogales, E. (2019) The complete structure of the human TFIIH core complex, *Elife*, **12**, e44771, doi: 10.7554/eLife.44771.
 30. Kokic, G., Chernev, A., Tegunov, D., Dienemann, C., Urlaub, H., and Cramer, P. (2019) Structural basis of TFIIH activation for nucleotide excision repair, *Nat. Commun.*, **10**, 2885, doi: 10.1038/s41467-019-10745-5.
 31. Kim, M., Kim, H. S., D'Souza, A., Gallagher, K., Jeong, E., Topolska-Wós, A., Ogorodnik Le Meur, K., Tsai, C. L., Tsai, M. S., Kee, M., Tainer, J. A., Yeo, J. E., Chazin, W. J., and Schäfer, O. D. (2022) Two interaction surfaces between XPA and RPA organize the preincision complex in nucleotide excision repair, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **119**, e2207408119, doi: 10.1073/pnas.2207408119.
 32. Krasikova, Y. S., Lavrik, O. I., and Rechkunova, N. I. (2022) The XPA protein-life under precise control, *Cells*, **11**, 3723, doi: 10.3390/cells11233723.

33. Van den Heuvel, D., Kim, M., Wondergem, A. P., van der Meer, P. J., Witkamp, M., Lambregtse, F., Kim, H. S., Kan, F., Apelt, K., Kragten, A., González-Prieto, R., Vertegaal, A. C. O., Yeo, J. E., Kim, B. G., van Doorn, R., Schärer, O. D., and Luijsterburg, M. S. (2023) A disease-associated XPA allele interferes with TFIIH binding and primarily affects transcription-coupled nucleotide excision repair, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **120**, e2208860120, doi: 10.1073/pnas.2208860120.
34. Li, C. L., Golebiowski, F. M., Onishi, Y., Samara, N. L., Sugawara, K., and Yang, W. (2015) Tripartite DNA lesion recognition and verification by XPC, TFIIH, and XPA in nucleotide excision repair, *Mol. Cell.*, **59**, 1025-1034, doi: 10.1016/j.molcel.2015.08.012.
35. Kemp, M. G., and Hu, J. (2017) Postexcision events in human nucleotide excision repair, *Photochem. Photobiol.*, **93**, 178-191, doi: 10.1111/php.12641.
36. González-Corrochano, R., Ruiz, F. M., Taylor, N. M. I., Huecas, S., Drakulic, S., Spínola-Amilibia, M., and Fernández-Tornero, C. (2020) The crystal structure of human XPG, the xeroderma pigmentosum group G endonuclease, provides insight into nucleotide excision DNA repair, *Nucleic Acids Res.*, **48**, 9943-9958, doi: 10.1093/nar/gkaa688.
37. Muniesa-Vargas, A., Theil, A. F., Ribeiro-Silva, C., Vermeulen, W., and Lans, H. (2022) XPG: a multitasking genome caretaker, *Cell. Mol. Life Sci.*, **79**, 166, doi: 10.1007/s00018-022-04194-5.
38. Hu, J., Choi, J. H., Gaddameedhi, S., Kemp, M. G., Reardon, J. T., and Sancar, A. (2013) Nucleotide excision repair in human cells: fate of the excised oligonucleotide carrying DNA damage *in vivo*, *J. Biol. Chem.*, **288**, 20918-20926, doi: 10.1074/jbc.M113.482257.
39. Krasikova, Y. S., Rechkunova, N. I., Maltseva, E. A., Pestryakov, P. E., Petruseva, I. O., Sugawara, K., Chen, X., Min, J. H., and Lavrik, O. I. (2013) Comparative analysis of interaction of human and yeast DNA damage recognition complexes with damaged DNA in nucleotide excision repair, *J. Biol. Chem.*, **288**, 10936-10947, doi: 10.1074/jbc.M112.444026.
40. Petruseva, I., Naumenko, N., Kuper, J., Anarbaev, R., Kappenberger, J., Kisker, C., and Lavrik, O. (2021) The interaction efficiency of XPD-p44 with bulky DNA damages depends on the structure of the damage, *Front. Cell Dev. Biol.*, **9**, 617160, doi: 10.3389/fcell.2021.617160.
41. Barnett, J., Kuper, J., Koelmel, W., Kisker, C., and Kad, N. (2019) The TFIIH subunits p44/p62 act as a damage sensor during nucleotide excision repair, *Nucleic Acids Res.*, **48**, 12689-12696, doi: 10.1093/nar/gkaa973.
42. Aboussekhra, A., Biggerstaff, M., Shivji, M. K. K., Vilpo, J. A., Moncollin, V., Podust, V. N., Protić, M., Hübscher, U., Egly, J. M., and Wood, R. D. (1995) Mammalian DNA nucleotide excision repair reconstituted with purified protein components, *Cell*, **80**, 859-868, doi: 10.1016/0092-8674(95)90289-9.
43. Szeltner, Z., Póti, A., Harami, G. M., Kovács, M., and Szüts, D. (2021) Evaluation and modulation of DNA lesion bypass in an SV40 large T antigen-based *in vitro* replication system, *FEBS Open Bio*, **11**, 1054-1075, doi: 10.1002/2211-5463.13099.
44. Du, H., Wang, P., Li, L., and Wang, Y. (2019) Repair and translesion synthesis of O6-alkylguanine DNA lesions in human cells, *J. Biol. Chem.*, **294**, 11144-11153, doi: 10.1074/jbc.RA119.009054.
45. Evdokimov, A., Petruseva, I., Tsidulko, A., Koroleva, L., Serpokrylova, I., Silnikov, V., and Lavrik, O. (2013) New synthetic substrates of mammalian nucleotide excision repair system, *Nucleic Acids Res.*, **41**, e123, doi: 10.1093/nar/gkt301.
46. Hilton, B., Gopal, S., Xu, L., Mazumder, S., Musich, P. R., Cho, B. P., and Zou, Y. Z. (2016) Dissociation dynamics of XPC-RAD23B from damaged DNA is a determining factor of NER efficiency, *PLoS One*, **11**, e0157784, doi: 10.1371/journal.pone.0157784.
47. Naumenko, N., Petruseva, I., Lomzov, A., and Lavrik, O. (2021) Recognition and removal of clustered DNA lesions via nucleotide excision repair, *DNA Repair (Amst)*, **108**, 103225, doi: 10.1016/j.dnarep.2021.103225.
48. Huang, J. C., and Sancar, A. (1994) Determination of minimum substrate size for human excinuclease, *J. Biol. Chem.*, **269**, 19034-19040, doi: 10.1016/S0021-9258(17)32270-6.
49. Hess, M. T., Gunz, D., Luneva, N., Geacintov, N. E., and Naegeli, H. (1997) Base pair conformation-dependent excision of benzo[a]pyrene diol epoxide-guanine adducts by human nucleotide excision repair enzymes, *Mol. Cell Biol.*, **17**, 7069-7076, doi: 10.1128/MCB.17.12.7069.
50. Gillet, L. C., Alzeer, J., and Schärer, O. D. (2005) Site-specific incorporation of N-(deoxyguanosin-8-yl)-2-acetylaminofluorene (dG-AAF) into oligonucleotides using modified 'ultra-mild' DNA synthesis, *Nucleic Acids Res.*, **33**, 1961-1969, doi: 10.1093/nar/gki335.
51. Dezhurov, S. V., Khodyreva, S. N., Plekhanova, E. S., and Lavrik, O. I. (2005) A new highly efficient photoreactive analogue of dCTP. Synthesis, characterization, and application in photoaffinity modification of DNA binding proteins, *Bioconjug. Chem.*, **16**, 215-222, doi: 10.1021/bc0497867.
52. Lukyanchikova, N. V., Petruseva, I. O., Evdokimov, A. N., Silnikov, V. N., and Lavrik, O. I. (2016) DNA with damage in both strands as affinity probes and nucleotide excision repair substrates, *Biochemistry (Moscow)*, **81**, 263-274, doi: 10.1134/S0006297916030093.
53. Kolbanovskiy, M., Aharonoff, A., Sales, A. H., Geacintov, N. E., and Shafirovich, V. (2020) Remarkable enhancement of nucleotide excision repair of a bulky guanine lesion in a covalently closed circular DNA plasmid relative to the same linearized plasmid,

- Biochemistry*, **59**, 2842-2848, doi: 10.1021/acs.biochem.0c00441.
54. Emerson, C. H., Lopez, C. R., Ribes-Zamora, A., Polleys, E. J., Williams, C. L., Yeo, L., Zaneveld, J. E., Chen, R., and Bertuch, A. A. (2018) Ku DNA end-binding activity promotes repair fidelity and influences end-processing during nonhomologous end-joining in *Saccharomyces cerevisiae*, *Genetics*, **209**, 115-128, doi: 10.1534/genetics.117.300672.
 55. Geacintov, N. E., and Broyde, S. (2017) Repair-resistant DNA lesions, *Chem. Res. Toxicol.*, **30**, 1517-1548, doi: 10.1021/acs.chemrestox.7b00128.
 56. Evdokimov, A., Kutuzov, M., Petrusheva, I., Lukjanchikova, N., Kashina, E., Kolova, E., Zemerova, T., Romanenko, S., Perelman, P., Prokopov, D., Seluanov, A., Gorbunova, V., Graphodatsky, A., Trifonov, V., Khodyreva, S., and Lavrik, O. (2018) Naked mole rat cells display more efficient excision repair than mouse cells, *Aging (Albany NY)*, **10**, 1454-1473, doi: 10.18632/aging.101482.
 57. Liu, Z., Ding, S., Kropachev, K., Lei, J., Amin, S., Broyde, S., and Geacintov, N. E. (2015) Resistance to nucleotide excision repair of bulky guanine adducts opposite abasic sites in DNA duplexes and relationships between structure and function, *PLoS One*, **10**, e0142068, doi: 10.1371/journal.pone.0137124.
 58. Song, J., Kemp, M. G., and Choi, J. H. (2017) Detection of the excised, damage-containing oligonucleotide products of nucleotide excision repair in human cells, *Photochem. Photobiol.*, **93**, 192-198, doi: 10.1111/php.12638.
 59. Lukyanchikova, N. V., Petrusheva, I. O., Evdokimov, A. N., Koroleva, L. S., and Lavrik, O. I. (2018) DNA bearing bulky fluorescent and photoreactive damage in both strands as substrates of the nucleotide excision repair system, *Mol. Biol. (Moscow)*, **52**, 237-246, doi: 10.1134/S0026893318020061.
 60. Govan, H. L., Valles-Ayoub, Y., and Braun, J. (1990) Fine-mapping of DNA damage and repair in specific genomic segments, *Nucleic Acids Res.*, **18**, 3823-3830, doi: 10.1093/nar/18.13.3823.
 61. Chesner, L. N., and Campbell, C. (2018) A quantitative PCR-based assay reveals that nucleotide excision repair plays a predominant role in the removal of DNA-protein crosslinks from plasmids transfected into mammalian cells, *DNA Repair (Amst)*, **62**, 18-27, doi: 10.1016/j.dnarep.2018.01.004.
 62. Shen, J. C., Fox, E. J., Ahn, E. H., and Loeb, L. A. (2014) A rapid assay for measuring nucleotide excision repair by oligonucleotide retrieval, *Sci. Rep.*, **4**, 4894, doi: 10.1038/srep04894.
 63. Aloisi, C. M. N., Nilforoushan, A., Ziegler, N., and Sturla, S. J. (2020) Sequence-specific quantitation of mutagenic DNA damage via polymerase amplification with an artificial nucleotide, *J. Am. Chem. Soc.*, **142**, 6962-6969, doi: 10.1021/jacs.9b11746.
 64. Jennerwein, M. M., and Eastman, A. (1991) A polymerase chain reaction-based method to detect cisplatin adducts in specific genes, *Nucleic Acids Res.*, **19**, 6209-6214, doi: 10.1093/nar/19.22.6209.
 65. Kalinowski, D. P., Illenye, S., and Van Houten, B. (1992) Analysis of DNA damage and repair in murine leukemia L1210 cells using a quantitative polymerase chain reaction assay, *Nucleic Acids Res.*, **20**, 3485-3494, doi: 10.1093/nar/20.13.3485.
 66. Azqueta, A., Langie, S. A. S., Boutet-Robinet, E., Duthie, S., Ladeira, C., Møller, P., Collins, A. R., and Godschalk, R. W. L. (2019) DNA repair as a human biomonitoring tool: Comet assay approaches, *Mutat. Res.*, **781**, 71-87, doi: 10.1016/j.mrrev.2019.03.002.
 67. Collins, A. R. (2004) The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations, *Mol. Biotechnol.*, **26**, 249-261, doi: 10.1385/MB:26:3:249.
 68. Vodenkova, S., Azqueta, A., Collins, A., Dusinska, M., Gaivão, I., Møller, P., Opattova, A., Vodicka, P., Godschalk, R. W. L., and Langie, S. A. S. (2020) An optimized comet-based *in vitro* DNA repair assay to assess base and nucleotide excision repair activity, *Nat. Protoc.*, **15**, 3844-3878, doi: 10.1038/s41596-020-0401-x.
 69. Vodicka, P., Vodenkova, S., Opattova, A., and Vodickova, L. (2019) DNA damage and repair measured by comet assay in cancer patients, *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.*, **843**, 95-110, doi: 10.1016/j.mrgentox.2019.05.009.
 70. Speit, G., Leibiger, C., Kuehner, S., and Högel, J. (2013) Further investigations on the modified comet assay for measuring aphidicolin-block nucleotide excision repair, *Mutagenesis*, **28**, 145-151, doi: 10.1093/mutage/ges063.
 71. Ge, J., Ngo, L. P., Kaushal, S., Tay, I. J., Thadhani, E., Kay, J. E., Mazzucato, P., Chow, D. N., Fessler, J. L., Weingeist, D. M., Sobol, R. W., Samson, L. D., Floyd, S. R., and Engelward, B. P. (2021) CometChip enables parallel analysis of multiple DNA repair activities, *DNA Repair (Amst)*, **106**, 103176, doi: 10.1016/j.dnarep.2021.103176.
 72. Valdíglesias, V., Sánchez-Flores, M., Fernández-Bertólez, N., Au, W., Pávaro, E., and Laffon, B. (2020) Expanded usage of the Challenge-Comet assay as a DNA repair biomarker in human populations: protocols for fresh and cryopreserved blood samples, and for different challenge agents, *Arch. Toxicol.*, **94**, 4219-4228, doi: 10.1007/s00204-020-02881-5.
 73. Cipollini, M., He, J., Rossi, P., Baronti, F., Micheli, A., Rossi, A. M., and Barale, R. (2006) Can individual repair kinetics of UVC-induced DNA damage in human lymphocytes be assessed through the comet assay? *Mutat. Res.*, **601**, 150-161, doi: 10.1016/j.mrfmmm.2006.06.004.
 74. Vande Loock, K., Decordier, I., Ciardelli, R., Haumont, D., and Kirsch-Volders, M. (2010)

- An aphidicolin-block nucleotide excision repair assay measuring DNA incision and repair capacity, *Mutagenesis*, **25**, 25-32, doi: 10.1093/mutage/geb039.
75. Muruzabal, D., Sanz-Serrano, J., Sauvaigo, S., Gützkow, K. B., López de Cerain, A., Vettorazzi, A., and Azqueta, A. (2020) Novel approach for the detection of alkylated bases using the enzyme-modified comet assay, *Toxicol. Lett.*, **330**, 108-117, doi: 10.1016/j.toxlet.2020.04.021.
 76. Ngo, L. P., Owiti, N. A., Swartz, C., Winters, J., Su, Y., Ge, J., Xiong, A., Han, J., Recio, L., Samson, L. D., and Engelward, B. P. (2020) Sensitive CometChip assay for screening potentially carcinogenic DNA adducts by trapping DNA repair intermediates, *Nucleic Acids Res.*, **48**, e13, doi: 10.1093/nar/gkz1077.
 77. Ge, J., Prasongtanakij, S., Wood, D. K., Weingeist, D. M., Fessler, J., Navasummrit, P., Ruchirawat, M., and Engelward, B. P. (2014) CometChip: a high-throughput 96-well platform for measuring DNA damage in microarrayed human cells, *J. Vis. Exp.*, **92**, e50607, doi: 10.3791/50607.
 78. Azqueta, A., Ladeira, C., Giovannelli, L., Boutet-Robinet, E., Bonassi, S., Neri, M., Gajski, G., Duthie, S., Del Bo', C., Riso, P., Koppen, G., Basaran, N., Collins, A., and Møller, P. (2020) Application of the comet assay in human biomonitoring: An hCOMET perspective, *Mutat. Res. Rev. Mutat. Res.*, **783**, 108288, doi: 10.1016/j.mrrev.2019.108288.
 79. Athas, W. F., Hedayati, M. A., Matanoski, G. M., Farmer, E. R., and Grossman, L. (1991) Development and field-test validation of an assay for DNA repair in circulating human lymphocytes, *Cancer Res.*, **51**, 5786-5793.
 80. Chu, G., and Chang, E. (1988) Xeroderma pigmentosum group E cells lack a nuclear factor that binds to damaged DNA, *Science*, **242**, 564-567, doi: 10.1126/science.3175673.
 81. Qiao, Y., Spitz, M. R., Guo, Z., Hedayati, M., Grossman, L., Kraemer, K. H., and Wei, Q. (2002) Rapid assessment of repair of ultraviolet DNA damage with a modified host-cell reactivation assay using a luciferase reporter gene and correlation with polymorphisms of DNA repair genes in normal human lymphocytes, *Mutat. Res.*, **509**, 165-174, doi: 10.1016/s0027-5107(02)00219-1.
 82. Roguev, A., and Russev, G. (2000) Two-wavelength fluorescence assay for DNA repair, *Anal. Biochem.*, **287**, 313-318, doi: 10.1006/abio.2000.4865.
 83. Burger, K., Matt, K., Kieser, N., Gebhard, D., and Bergemann, J. (2010) A modified fluorimetric host cell reactivation assay to determine the repair capacity of primary keratinocytes, melanocytes and fibroblasts, *BMC Biotechnol.*, **10**, 46, doi: 10.1186/1472-6750-10-46.
 84. Kitsera, N., Rodriguez-Alvarez, M., Emmert, S., Carell, T., and Khobta, A. (2019) Nucleotide excision repair of abasic DNA lesions, *Nucleic Acids Res.*, **47**, 8537-8547, doi: 10.1093/nar/gkz558.
 85. Popov, A. A., Orishchenko, K. E., Naumenko, K. N., Evdokimov, A. N., Petruseva, I. O., and Lavrik, O. I. (2021) A method for assessing the efficiency of the nucleotide excision repair system *ex vivo*, *Acta Naturae*, **13**, 122-125, doi: 10.32607/actanaturae.11430.
 86. Evdokimov, A. N., Tsidulko, A. N., Popov, A. V., Vorobiev, Y. N., Lomzov, A. A., Koroleva, L. S., Silnikov, V. N., Petruseva, I. O., and Lavrik, O. I. (2018) Structural basis for the recognition and processing of DNA containing bulky lesions by the mammalian nucleotide excision repair system, *DNA Repair (Amst)*, **61**, 86-98, doi: 10.1016/j.dnarep.2017.10.010.
 87. Pielt, C. G., Pecan, T. J., Laverty, D. J., and Nagel, Z. D. (2021) Large-scale preparation of fluorescence multiplex host cell reactivation (FM-HCR) reporters, *Nat. Protoc.*, **16**, 4265-4298, doi: 10.1038/s41596-021-00577-3.
 88. Kitsera, N., Stathis, D., Lühnsdorf, B., Müller, H., Carell, T., Epe, B., and Khobta, A. (2011) 8-Oxo-7,8-dihydroguanine in DNA does not constitute a barrier to transcription, but is converted into transcription-blocking damage by OGG1, *Nucleic Acids Res.*, **39**, 5926-5934, doi: 10.1093/nar/gkr163.
 89. Kogan, V., Molodtsov, I., Menshikov, L. I., Reis, R. J. S., and Fedichev, P. (2015) Stability analysis of a model gene network links aging, stress resistance, and negligible senescence, *Sci. Rep.*, **5**, 13589, doi: 10.1038/srep13589.

NUCLEOTIDE EXCISION REPAIR. METHODS OF DETERMINATION THE EFFICIENCY FUNCTIONING

Review

A. A. Popov¹, I. O. Petruseva¹, N. V. Naumenko¹, and O. I. Lavrik^{1,2*}

¹ Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine Siberian Branch Russian Academy of Sciences,
630090 Novosibirsk, Russia; e-mail: lavrik@niboch.nsc.ru

² Novosibirsk National Research State University, 630090 Novosibirsk, Russia

The nucleotide excision repair (NER) system is responsible for removing a wide range of bulky damages from DNA, making a significant contribution to maintaining the stability of the genome. The efficiency with which the proteins of the NER system recognize and remove bulky damages depends on many factors and has important clinical and diagnostic significance. The review examines the current understanding of the molecular basis of the functioning of the NER system in eukaryotic cells, as well as analyzes the methods and approaches that are used to study the efficiency functioning of this DNA repair system both *in vitro* and *ex vivo*.

Keywords: nucleotide excision repair, DNA damages, methods for determining NER activity