

УДК 577.213

В.Н. ЗАЕЦ¹, П.А. КАРПОВ¹,
П.С. СМЕРТЕНКО², Я.Б. БЛЮМ¹

¹ Институт клеточной биологии и генетической инженерии
НАН Украины, Киев

² Институт физики полупроводников НАН Украины, Киев

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ УСТРАНЕНИЯ РАСТЕНИЯМИ ПОВРЕЖДЕНИЙ ДНК УЛЬТРАФИОЛЕТОМ



Одним из факторов, повреждающих и дестабилизирующих геномы, является УФ-В излучение Солнца. Вызываемые УФ-В повреждения ДНК являются цитотоксичными и генотоксичными для клеток про- и эукариот, включая и растения. Кроме того, эти повреждения могут быть и источником генных мутаций в растениях. В обзоре рассмотрены продукты повреждения клеточной ДНК ультрафиолетом и проанализированы имеющиеся у растений репаративные пути, используемые ими для устранения этих повреждений: фотореактивация и эксцизионные механизмы репарации оснований и нуклеотидов. Рассматриваются также толерирующие механизмы, позволяющие снизить токсичный эффект воздействия ультрафиолета на растения.

© В.Н. ЗАЕЦ, П.А. КАРПОВ, П.С. СМЕРТЕНКО,
Я.Б. БЛЮМ, 2006

Введение. Ультрафиолетовая радиация Солнца является одним из наиболее опасных по отношению к живой природе факторов окружающей среды. Она сопутствовала всей эволюции органического мира и в наши дни продолжает оказывать негативное воздействие на рост и развитие животных и растительных организмов [1, 2]. Особенно это касается растений, которые из-за прикрепленного образа жизни и потребности в солнечном свете для процессов фотосинтеза подвержены постоянному облучению ультрафиолетом.

В зависимости от длины волны биологически значимый спектр ультрафиолетовой радиации принято подразделять на УФ-С (200—280 нм), УФ-В (280—320 нм) и УФ-А (320—400 нм) области. Особо опасным для живых организмов является УФ-С и УФ-В излучение, поскольку оно легко поглощается основными молекулярными компонентами клетки — белками и нуклеиновыми кислотами, что может привести к их повреждению и, как следствие, явиться причиной остановки клеточного цикла, генных мутаций и даже клеточной смерти [3]. К счастью, в естественных условиях УФ-С и наиболее агрессивная часть УФ-В, вплоть до 295 нм, полностью поглощаются озоновым слоем земной атмосферы и не оказывают никакого влияния на живые организмы. Однако энергия и той части УФ-В, которая достигает земной поверхности, достаточна для того, чтобы вызвать значительные повреждения клеточных структур и иметь серьезные последствия для клетки. С ее действием непосредственно связаны образование злокачественных опухолей у человека и животных [4], а также наблюдаемые разнообразные ответные реакции у растений [5—7]. К ним относятся фотоморфогенетические изменения [8], уменьшение биомассы [9], уменьшение количества зрелой пыльцы [10], снижение способности хлебных злаков к конкурентной борьбе с сорняками [11], накопление флавоноидов в эпителиальных тканях [12, 13], нестабильность генома [14, 15].

Перечисленные реакции в большинстве своем являются результатом первичного повреждения ультрафиолетом многих клеточных компонентов растительных организмов на молекулярном уровне, проявляющимся в нарушении функционирования ядерной, митохондриальной и пластидной ДНК, угнетении

активности фотосинтетического аппарата клетки, изменении проницаемости мембран, нарушении функции клеточных ферментов и инактивации гормонов [5—7, 14, 16]. Среди них повреждение структуры и целостности клеточной ДНК, по-видимому, является главным фактором, обуславливающим комплексный ответ растений на облучение ультрафиолетом, их чувствительность к УФ радиации [14, 16, 17].

Постоянная экспозиция растений к УФ-В форсировала у них выработку в процессе эволюции ряда эффективных защитных мер, позволяющих им адаптироваться к природному уровню ультрафиолетовой радиации в окружающей среде и избежать повреждения своего генома. К одним из них относятся накопление флавоноидных соединений в эпителиальных клеточных слоях, поглощающих большую часть фотонов УФ-В и таким образом снижающих вероятность повреждения подлежащих меристематических тканей растений, а также образование антиоксидантов в клетках растений, нейтрализующих индуцируемые ультрафиолетом опаснейшие для внутриклеточных структур реакционные виды кислорода [1, 2]. Мутантные растения с повышенным уровнем этих соединений более устойчивы к УФ-В [18]. Однако основная роль в защите генома растений от повреждения ультрафиолетом принадлежит различным репарационным механизмам, ответственным за непосредственное устранение повреждений в структуре ДНК и обеспечение постоянства ее нуклеотидного состава. Мутации по генам репаративных механизмов вызывают повышенную чувствительность растений к ультрафиолетовой радиации, снижение их адаптационных свойств [19—21].

Знание репарационных механизмов растений и понимание их функционирования имеют крайне важное значение в современной биологии как в чисто научном, так и в прикладном аспектах, поскольку репарация тесно связана с такими фундаментальными клеточными процессами, как репликация, транскрипция и регуляция клеточного цикла, а повышение репарационных свойств растений может быть одним из генноинженерных подходов к созданию высокопродуктивных сортов, устойчивых ко многим вредным факторам окружающей среды [22]. Особую

актуальность приобретает исследование репаративных механизмов растений в наши дни в связи с наблюдаемым в последние годы увеличением потока коротковолновой ультрафиолетовой радиации к земной поверхности вследствие уменьшения озонового слоя атмосферы планеты, которое может негативным образом сказаться на адаптационных свойствах и урожайности сельскохозяйственных культур [21].

За последние несколько лет, начиная с момента завершения секвенирования генома арабидопсиса, в области исследования репарационных механизмов растений достигнуты колоссальные успехи. Наличие полной растительной геномной последовательности дало возможность сравнить ее с уже известными последовательностями дрожжей и человека, в результате чего в геноме арабидопсиса были идентифицированы гомологи генов белковых компонентов всех известных у них репарационных путей [14, 23—25]. Многие из этих генов клонированы, и частично исследованы функциональные свойства кодируемых ими репарационных факторов. Начинают эффективно исследоваться молекулярные основы рекомбинации и интеграции в растительные геномы трансгенов, что является залогом будущих успехов в области генетической инженерии растений [26].

Целью настоящего обзора является краткое обобщение современных данных о репаративных механизмах растений, молекулярных основах этих механизмов, при необходимости в сравнении с аналогичными механизмами млекопитающих и дрожжей, а также особенностях их функционирования в растениях для репарации ультрафиолетовых повреждений их генома. Кроме того, в обзоре частично затронуты и вопросы, касающиеся толерирующих механизмов растений, поскольку они играют важную роль в выживании прокариотических и эукариотических организмов после повреждения их ДНК ультрафиолетом.

Продукты УФ повреждения ДНК

В настоящее время накоплен большой фактический материал относительно воздействия ультрафиолетового излучения на нуклеиновые компоненты животных и растительных клеток, охарактеризованы многие продукты

фотохимического превращения пуриновых и пиримидиновых оснований ДНК и РНК, показана их роль в возникновении цитотоксичных эффектов и мутаций.

Среди огромного количества продуктов ультрафиолетового облучения ДНК как *in vivo*, так и *in vitro* основными являются пиримидиновые димеры, формируемые между смежными основаниями на одной и той же цепи ДНК. Из них примерно 75 % составляют *cis-syn* димеры циклобутанового типа (cyclobutane pyrimidine dimers, CPD) и около 25 % — пиримидин(6—4)пиримидоновые производные (pyrimidine(6—4)pyrimidone photoproducts) [27—29]. Последние при дальнейшем облучении ультрафиолетом с длиной волны около 300—320 нм могут частично превращаться в валентные изомеры Dewag в соотношении 1:10 [30]. Приведенные соотношения являются примерными и могут варьировать в зависимости от вида организма, типа ткани и стадии ее развития.

Циклобутановые димеры образуются в результате фотонасыщения углеродных атомов в 5-м и 6-м положении смежных пиримидиновых оснований и формирования между ними циклобутанового кольца. В ряду возможных дипиримидинов циклобутанового типа наиболее стабильными и чаще встречающимися являются тиминовые димеры Т-Т и в меньшей мере Т-С и С-С производные. Среди пиримидин(6—4)пиримидонов наиболее часто встречаются Т-С и С-С аддукты [31]. Образование обоих классов дипиримидинов определяется нуклеотидным составом ДНК и в значительной степени зависит от гибкости двойной спирали и структуры хроматина [32, 33]. Большое влияние на их формирование оказывают белки и белковые комплексы, нарушающие В-форму ДНК. Показано, что связывание транскрипционных факторов с промоторными последовательностями активных генов приводит не только к увеличению количества димерных фотопродуктов, но и определяет их селективное образование [34, 35].

УФ-В радиация, помимо пиримидиновых димеров, индуцирует появление целого ряда минорных мономерных фотопроизводных, однако структура большинства из них и реальное значение этих продуктов как мутагенов и цитотоксичных агентов мало исследованы.

Дипиримидины циклобутанового типа и пиримидин(6—4)пиримидоновые аддукты являются наиболее изученным классом повреждений ДНК ультрафиолетом. Они найдены у микроорганизмов, дрожжей, клеточных линий млекопитающих и растений [3, 14, 16, 36]. В экспериментальных условиях повреждения более эффективно индуцируются при длине волны 260 нм, что объясняется максимальным поглощением ДНК в данной области. В меньшей степени пиримидиновые димеры образуются под воздействием УФ-В (280—320 нм) и УФ-А (320—400 нм) радиации. Основной вклад в повреждения клеточной ДНК в природных условиях вносит УФ-В радиация, достигающая земной поверхности (295—320 нм). Хотя она представляет лишь 5 % суммарного ультрафиолетового излучения, на ее долю приходится основная часть всех повреждений ДНК ультрафиолетом [31]. Эффект обусловлен высокой поглощающей способностью растительных и животных тканей по отношению к квантам света в данной области солнечного спектра и высокой эффективностью поглощенных фотонов ультрафиолета в фотохимических реакциях. Остальная часть фотоповреждений клеточной ДНК приходится на УФ-А область солнечной радиации. До недавнего времени полагали, что УФ-А не играет сколь-нибудь существенной роли в негативном воздействии солнечной радиации на живые объекты, поскольку он слабо поглощается клеточной ДНК. Однако в последнее время на клеточных линиях животных показаны серьезные мутагенные эффекты УФ-А как вследствие прямого поглощения излучения клеточной ДНК с образованием димеров, так и в результате непрямого повреждения генома индуцируемыми УФ-А реакционными видами кислорода [3, 31, 37]. Вклад УФ-А в образование димерных продуктов в ДНК у растений был установлен Квайтом и соавт. [38, 39]. Пронализировав образование циклобутановых димеров у проростков люцерны в зависимости от длины волны ультрафиолетового излучения в области от 280 до 400 нм, авторы пришли к выводу, что прямые повреждения ДНК индуцируются вплоть до 365 нм. При этом пик поглощения клеточной ДНК сдвигается по отношению к свободной ДНК с 260 до 280 нм. Наблюдаемый сдвиг, по мнению ис-

следователей, является следствием межклеточной и внутриклеточной организации ткани и ослабления светового потока за счет пигментированных эпителиальных слоев.

Биологические эффекты обоих классов пиримидиновых димеров интенсивно исследовались на микроорганизмах, дрожжах и, особенно в последнее время, на клеточных линиях человека. CPD и (6—4) фотопродукты обладают ярко выраженными цитотоксичными свойствами, проявляющимися в стерическом блокировании продвижения клеточных ДНК- и РНК-полимераз в местах повреждений в процессах репликации и транскрипции [40]. Причиной остановки репликации является то, что ДНК-полимеразы при попытке включения любых нуклеотидов напротив повреждений в ходе синтеза дочерних цепей ДНК узнают их как неправильные и удаляют из синтезируемой цепи за счет ассоциированной с ферментами корректирующей 3'→5' экзонуклеазной активности. Как следствие, полимеразы вынуждены реинициировать процесс репликации со вновь синтезированных праймеров за повреждением по ходу репликации и оставлять незастроенные бреши в реплицируемых молекулах ДНК.

Причиной задержки РНК-полимераз напротив продуктов УФ-повреждения пиримидиновых оснований димерного типа в транскрибируемой цепи ДНК и последующей остановки транскрипции являются, скорее всего, большие нарушения вторичной структуры нуклеиновых кислот в местах повреждений, несовместимые с процессом считывания информации соответствующими транскрибирующими ферментными комплексами [41—43]. В отсутствие репарации один единственный пиримидиновый димер может полностью выключить экспрессию гена [42]. Если ген уникален и кодирует функционально важный фермент, последствия могут быть губительными для клетки. Кроме того, на клеточных линиях млекопитающих показано, что РНК-полимераза II остается связанной с поврежденными сайтами на ДНК, снижая таким образом концентрацию свободных РНК-полимераз в клетке [43].

Пиримидиновые димеры циклобутанового типа и пиримидин(6—4)пиримидиновые аддукты обладают также и мутагенными свой-

ствами, хотя их мутагенный характер выражен в меньшей степени, чем токсичные свойства [29, 31, 40, 44, 45]. По-видимому, (6—4) фотопродукты имеют более высокий мутагенный потенциал, чем CPD, однако из-за их относительно меньшего количества и повышенной скорости удаления из генома экспериментально определяемый уровень мутагенеза коррелирует больше с циклобутановыми димерами. Преобладающими мутациями являются транзиции G:C—A:T, A:T—G:C, двойные замены GC—AT, CC—TT и трансверсии G:C—T:A, A:T—T:A, A:T—C:G. На вид мутаций оказывает влияние состав первичной последовательности вблизи поврежденных оснований. Наиболее часто замены локализуются вокруг тиминовых димеров, являющихся горячими точками мутагенеза [34].

Пиримидиновые димеры не являются прямыми мутагенами, поскольку не могут эффективно спариваться с другими нуклеотидами в процессе репликации. Возникновение мутаций связано, вероятно, с вовлечением клеткой для исправления повреждений геномной ДНК рекомбинационного механизма пострепликативной репарации или механизма, позволяющего специальным клеточным ДНК-полимеразам преодолевать поврежденные участки матрицы в обход повреждения (bypass) [3, 14, 40, 45].

Кроме прямого повреждения ДНК, УФ-В индуцирует образование реакционных видов кислорода, которые могут вызывать окислительные фотомодификации пуриновых и пиримидиновых оснований, окисление дезоксирибозы, ДНК-белковые сшивки и потенциально опасные для клеток однонитевые разрывы ДНК, которые могут конвертироваться в процессе репликативного синтеза в двухцепочечные разрывы и привести к клеточной смерти [46—49]. Наиболее существенными из окисленных оснований являются пиримидиновые фотогидраты, тиминовые гликоли, 8-оксогуанин и формидопиримидины. Все они мутагены, а тиминовые гликоли, 8-оксогуанин и фрагментированные пурины обладают, кроме того, еще и цитотоксичными свойствами [40, 46, 47].

Хотелось бы отметить, что на растительных системах механизм возникновения точечных мутаций и их спектр еще практически не изучены. Наши знания в данной области ограни-

чены лишь большими хромосомными перестройками и делециями, возникающими в облученной пыльце. Пробел частично объясняется необычно высокой резистентностью растений к последствиям мутагенеза, а также общей тенденцией растений к уменьшению кодируемой области генов. Она намного меньше кодируемой последовательности генов животных, что создавало до последнего времени определенные трудности при исследовании геномов растений на молекулярном уровне.

Среди других повреждений клеточной ДНК ультрафиолетом, изученных в меньшей степени, являются пришивки белков к ДНК. Частота возникновения подобных нарушений на 2—3 порядка ниже, чем дипиримидиновых сшивок, но они могут создать серьезные проблемы для клетки. К ним можно отнести некорректное включение оснований при репликации в процессе клеточного деления или сдвиг рамки считывания внутри кодируемых последовательностей генов, что в конечном счете приведет к мутациям или появлению стоп-кодонов и преждевременному прекращению трансляции мРНК поврежденных генов.

Репаративные механизмы защиты ДНК растениями от повреждения ультрафиолетом

Геномы всех живых существ постоянно подвергаются широкому ряду генотоксичных стрессов, вызываемых различного рода факторами окружающей среды, такими как, например, ультрафиолетовая радиация, ионизирующее излучение, бактериальные токсины, или эндогенными факторами, среди которых наибольшее значение имеют алкилирующие и окисляющие агенты [14, 40, 47].

Все перечисленные факторы вызывают образование большого количества разного рода повреждений клеточной ДНК. Хотя повреждения ДНК часто ассоциируют с мутагенезом, их реальное значение, т.е. токсичность или мутагенность, зависит от химической природы повреждений и эффективности, с которой они устраняются клеткой.

Для сохранения целостности своего генома все организмы, в том числе и растения, развили в процессе эволюции ряд защитных механизмов, позволяющих восстановить большинство повреждений клеточной ДНК. В

зависимости от способов репарации повреждений, их специфичности к субстратам или размеров удаляемых фрагментов ДНК различают прямую реактивацию, эксцизионную репарацию оснований и нуклеотидов, пострепликативную репарацию неспаренных нуклеотидов и рекомбинационную репарацию [49—54]. Все механизмы устранения повреждений ДНК были вначале обнаружены и изучены в бактериях, позже охарактеризованы в эукариотах (дрожжи и животные), а в последнее время начали интенсивно исследоваться и на растениях [14, 21].

Фотореактивация. Биологические эффекты УФ-облучения у многих организмов могут быть устранены последующей их экспозицией к видимой или ближней ультрафиолетовой областям солнечного спектра. Этот феномен известен как фотореактивация [50, 51, 55]. Он реализуется фотолиазами — ферментами, специфически связывающимися с *cis-syn* циклобутановыми димерами и катализирующими их восстановление до исходных мономеров за счет энергии поглощенных квантов света в области 300—600 нм. Наиболее изученная фотолиаза *Escherichia coli* содержит два кофактора: флавиновый хромофор как донор электронов и птериноновый хромофор как акцептор фотонов. Такая структура фотолиаз, по-видимому, законсервирована в процессе эволюции, хотя акцепторный хромофор может быть переменным и включать диазофлаavin вместо птерина [56, 57]. До недавнего времени были известны два класса фотолиаз. Фотолиазы первого типа распространены среди прокариот и дрожжей. Фотолиазы, относящиеся ко второму классу, найдены у архебактерий, эубактерий, насекомых, рыб и растений. Оба класса имеют лишь 10—15 % гомологии, однако являются функционально заменимыми и могут комплементировать мутантные штаммы бактерий, дефектные по фотолиазе. Низкий уровень гомологии отражает раннее расхождение фотолиаз в процессе эволюции от одного предкового гена [55].

Позже был открыт еще один необычный класс фотолиаз, специфичных к пиримидин (6—4)пиримидиновым димерам. Впервые обнаруженный у дрозофилы, он затем был найден и у земноводных, и у растений [55, 58, 59].

По своей последовательности (6—4) фотолиаза более близка к бактериальному, чем к эукариотическому типу фотолиаз [55, 58, 60].

Завершение секвенирования генома арабидопсиса позволило определить число фотолиазных последовательностей в растении [14, 23—25]. Согласно оценке генома арабидопсиса в нем содержится шесть последовательностей, пять из которых близки к фотолиазам бактериального типа, включая гены (6—4) фотолиазы и криптохромов CRY1 и CRY2, и одна последовательность родственна CPD фотолиазам эукариот. Интересно отметить, что белки CRY1 и CRY2 не являются фотолиазами, хотя по своей аминокислотной последовательности и близки к ним, отличаясь от последних лишь COOH-концом. Они относятся к классу фоторецепторов и выполняют в клетке сенсорную функцию восприятия голубого света [61].

Фотореактивация является наиболее изученным процессом репарации УФ-повреждений у растений. Она снижает у растений ряд таких хорошо известных эффектов ультрафиолетового облучения, как мутагенез, хромосомные перестройки, ингибирование роста, индукция флавоноидных пигментов и репаративный синтез ДНК.

Наличие фотолиазной активности обнаружено у арабидопсиса [62, 63], салата [64], сорго [65], риса [66], люцерны [67], кукурузы [12], огурца [68], сои [69] и пшеницы [70].

Фотореактивация, по-видимому, является преобладающим механизмом в общем процессе репарации УФ-повреждений клеточной ДНК у растений [24, 71—73]. Панг и др. [63] нашли, что УФ-индуцированные CPD в проростках арабидопсиса очень быстро удаляются на свету специфичной к ним фотолиазой до 50% в течение 1 ч и значительно медленнее удаляются в темноте по эксцизионному механизму. Согласно их оценке вклад эксцизионного удаления димеров составлял лишь 5 % от общего уровня репарации повреждений. Фотолиазная активность индуцировалась ультрафиолетом и регулировалась в процессе развития, достигая максимального значения к середине жизни растений. Быстрое снижение уровня CPD и (6—4) фотопродуктов в клетках растений после облучения УФ-В и последующей их

экспозиции к УФ-А и видимому свету было продемонстрировано также Дани и соавт. [73]. Аналогичные данные были получены на проростках люцерны [67]. При индуцированном УФ-В уровне циклобутановых димеров 8 CPD/10⁶ пар оснований их полное удаление в проростках осуществлялось в течение 2 ч, тогда как эксцизионный репаративный синтез практически отсутствовал. Его индукция происходила лишь при дозах УФ, вызывающих образование свыше 30 димеров на 1 млн пар оснований клеточной ДНК. На резистентных к УФ линиях риса было определено, что такой уровень CPD является насыщающим для фотолиаз, а число фоторепарированных димеров отражает максимальную концентрацию активных фотолиаз в клетке [66]. Можно заключить, следовательно, что эксцизионная репарация пиримидиновых димеров у некоторых видов растений не функционирует постоянно и индуцируется только тогда, когда фотолиазы уже не в состоянии справиться с повреждениями сами. С помощью гибридизации *in situ* и нозерн-гибридизации, а также в результате анализа продуктов экспрессии репарационных генов с помощью биочипов была продемонстрирована предпочтительность функционирования репарационных систем в зависимости от органов и тканей растений [72]. Было показано, что удаление продуктов УФ-повреждения ДНК в пролиферирующих меристемных тканях апикальных частей корней и побегов риса осуществляется как фотолиазами, так и эксцизионными механизмами, а в непролиферирующих тканях зрелых листьев и стеблей — в основном фотолиазами.

Анализ чувствительных к ультрафиолету дефектных по темновой репарации мутантных линий арабидопсиса *uvr1*, полученных Бритт и соавт. [74], позволил установить, что и (6—4) фотопродукты эффективно удаляются из генома растений с помощью фотолиаз, специфичных к данному виду повреждений. Позже на мутантах *uvr2* и *uvr3*, дефектных по фотореактивации CPD и (6—4) фотопродуктов соответственно, авторами было показано, что (6—4) фотолиаза не требует индукции ультрафиолетом и характеризуется постоянным уровнем экспрессии в клетке, тогда как для экспрессии специфичной к CPD фотолиазы требуется ак-

тивация УФ-В или видимым светом [59, 62]. Кроме того, было установлено, что скорость реактивации (6—4) фотопродуктов у арабидопсиса так же, как и в клетках дрожжей и млекопитающих, значительно превосходит скорость репарации циклобутановых димеров [27, 51, 62]. Это верно как для всего генома, так и для однокопийных генов. На ХРА дефектных клетках человека, трансгенных по генам CPD и (6—4) фотолиаз, показано, что повреждения клеточной ДНК циклобутанового типа индуцируют остановку клеточного цикла, а (6—4) фотопродукты ведут к апоптозу [75]. Поэтому возможно, что высокая скорость удаления пиримидин(6—4)пиримидиновых аддуктов в процессе фотореактивации отражает особую токсичность этих соединений для растительных и животных клеток. В то же время мутанты арабидопсиса, дефектные по CPD фотолиазе, более чувствительны к УФ, чем мутанты по (6—4) фотолиазе, что связано, по-видимому, с большей долей в спектре индуцированных ультрафиолетом димерных фотопродуктов соединений циклобутанового типа [45, 76].

К настоящему времени клонированы растительные гены CPD фотолиаз арабидопсиса [77], огурца [68], шпината [78] и риса [79]. Для поиска генов арабидопсиса *PHR1* и огурца *CsPFR* были использованы олигонуклеотидные праймеры к высококонсервативной области фотолиаз второго типа млекопитающих, а для позже клонированных генов шпината и риса — последовательности, комплементарные ДНК генов CPD фотолиаз арабидопсиса и хламидомонасы. Из способности этих генов комплементировать дефектные по фотолиазе мутантные штаммы *E. coli* следует, что они кодируют функциональные ферменты. Как показал генетический и биохимический анализ, клонированные последовательности *CsPFR* и *PHR1* представлены в геноме растений одной копией, содержат сигналы ядерной локализации и индуцируются ближним ультрафиолетом и видимым светом. При сравнении нуклеотидных последовательностей гена *PHR1* и гомологичного гена из полученного ранее Ландри и соавт. [19] чувствительного к ультрафиолету мутанта арабидопсиса *ivr2*, не способного к фотореактивации циклобутановых димеров, выяснилось, что мутантный фенотип

растения является результатом делеции одного гуанинового остатка в 28-м положении первого экзона гена *PHR1*. Делеция привела к сдвигу рамки считывания и появлению стоп-кодона в нуклеотидной последовательности структурной части гена фотолиазы.

Клонированные гены позволили прямо оценить уровень их экспрессии в разных органах растений [68, 77, 78]. Было показано, что содержание активных фотолиаз варьирует в растениях в зависимости от вида ткани, возраста листьев и времени суток. Наиболее высокое содержание транскриптов было отмечено в цветках и листьях 3—5-недельных растений арабидопсиса и в цветках огурца. Их уровень варьировал в течение дня, достигая самого высокого значения в полдень, когда поток ультрафиолетового излучения Солнца максимален. Эти данные хорошо коррелируют с наличием лишь незначительного колебания уровня дипиримидиновых повреждений в геноме растений независимо от времени их экспозиции к солнечному свету [69]. Повышенная же концентрация ферментов в генеративных органах исследуемых растений и молодых, активно делящихся тканях, по-видимому, связана с необходимостью более строгой защиты их ДНК от повреждений. Более подробный анализ распределения CPD и (6—4) фотолиаз в различных органах арабидопсиса с помощью антител к фотоферментам дал сходные результаты [71]. Авторами было отмечено синхронное увеличение CPD фотолиаз в молодых развивающихся листьях параллельно с развитием их фотосинтетического аппарата, а также показано наличие функционально активной (6—4) фотолиазы во всех органах растения, за исключением корней.

Одновременно с геном CPD фотолиазы арабидопсиса был клонирован и ген (6—4) фотолиазы растения *UVR3* [60]. Ген был получен в результате амплификации растительной кДНК с помощью праймеров на высококонсервативную область (6—4) фотолиазы дрозофилы и достраивания 5'- и 3'-концов амплифицированного фрагмента с помощью метода быстрой амплификации концов кДНК (rapid amplification of cDNA ends, RACE). Полная последовательность гена была клонирована в экспрессирующем векторе pGEX (pGEX64At). Было

продемонстрировано, что трансформация плазмиды с рекомбинантным геном в мутантный *uvrA⁻recA⁻phr⁻* штамм *E. coli*, дефектный по репарации УФ-фотопродуктов, повышает устойчивость последнего к УФ-облучению, а продукты гена репарируют 6—4 Т—Т аддукты в олигонуклеотидах *in vitro*. Анализ нуклеотидной последовательности (6—4) фотолиз из разных организмов обнаружил высокую степень их гомологии. Идентичность гена *UVR3* арабидопсиса с генами ферментов дрозофилы и шпорцевой лягушки составляет 45 и 47 %, а с фотолиазной последовательностью человека — 50 %. Данная последовательность идентифицирована у человека, но, по-видимому, она не кодирует функциональный фермент [58]. Сравнение последовательностей генов *UVR3* из родительской линии арабидопсиса и его гомолога из мутантной линии *uvr3*, дефектной по репарации (6—4) фотопродуктов, показало, что они различаются лишь единственной заменой гуанина на аденин в 359-м кодоне гена. Мутация оснований привела к образованию стоп-кодона (нонсенс-мутации) в транскрибируемой последовательности и возникновению мутантного фенотипа растения.

Эксцизионная репарация. Функционирующая у растений система фотореактивации является основным механизмом удаления CPD и (6—4) фотопродуктов в клетке. Однако она не в состоянии справиться со всеми возможными повреждениями ДНК ультрафиолетом как вследствие отсутствия ее в ряде растительных органов, так и в связи с высокой специфичностью фотолиз только к одному виду повреждений — пиримидиновым димерам.

Для устранения других возможных повреждений, в том числе и пиримидиновых димеров, растения используют темновой, или эксцизионный, репаративный механизм. Он достаточно хорошо изучен у бактерий, дрожжей и в меньшей степени у млекопитающих [51, 53, 54, 80, 81]. У растений механизмы эксцизионной репарации изучены крайне недостаточно. Однако в последние несколько лет в этом направлении произошел весьма ощутимый прогресс, обусловленный прежде всего успехами в области сравнительной геномики и генетической инженерии растений. Полученные к этому времени данные дают право утвер-

ждать, что механизмы эксцизионной репарации у растений существуют и имеют много общих черт с аналогичными механизмами других эукариот, причем по составу репарационных комплексов они даже более близки к защитным механизмам млекопитающих, чем другим классам эукариотических организмов [14, 21, 23—25].

В отличие от фотореактивации в процессе темновой репарации не происходит восстановления исходных модифицированных оснований, а они заменяются новыми, неповрежденными. Различают два вида эксцизионной репарации — репарацию оснований (base excision repair, BER) и репарацию нуклеотидов (nucleotide excision repair, NER). В случае BER поврежденные основания из ДНК удаляются ДНК-гликозилазами, гидролизующими N-гликозидную связь между основанием и дезоксирибозой, а затем образовавшиеся апурино/апиримидиновые сайты (AP-сайты) узнаются AP-эндонуклеазами или гликозилазами с ассоциированной AP-лиазной функцией, сахарофосфатный остов расщепляется, а образовавшиеся бреши заполняются неповрежденными корректными нуклеотидами ДНК-полимеразой. Лигаза восстанавливает исходную нативную структуру нуклеиновых кислот. Это высокоспецифичный механизм удаления повреждений. За редким исключением, ДНК-гликозилазы узнают лишь определенный тип повреждений азотистых оснований.

Известны два пути BER: Pol β-зависимый, при котором вырезается из цепи ДНК только один поврежденный нуклеотид, и Pol ε/δ-зависимый, в ходе которого в процессе репарации могут удаляться от 2 до 10 нуклеотидов (рис. 1). Выбор клеткой репаративного пути определяется характером повреждения. По первому пути BER, являющемуся преобладающим у эукариот, репарируются, как правило, модифицированные основания и нормальные AP-сайты, по второму пути — восстановленные или окисленные аномальные AP-сайты и одноцепочечные разрывы ДНК.

У млекопитающих по механизму BER восстанавливаются апуриновые сайты и удаляются мутагенные продукты дезаминирования цитозина — урацил и 5'-метилурацил, а также урацил, ошибочно включенный в ДНК в про-



Рис. 1. Механизм эксцизионной репарации оснований у человека. Процесс инициируется специфическими к поврежденным основаниям гликозилазами и гликозилазами/AP-лиазами, выщепляющими поврежденные основания. Затем фосфодиэфирные связи в AP-сайтах расщепляется с 5'- и 3'-сторон от повреждения AP-эндонуклеазами (APE1) и бифункциональными гликозилазами за счет ассоциированной β-лиазной функции. В случае преобладающего Polβ-зависимого пути (I) Polβ вставляет комплементарный нуклеотид в поврежденный сайт, вытесняя вырезанный нуклеазами сахарофосфатный фрагмент. Если имеется лишь APE1 разрез цепи ДНК, Polβ сама устраняет сахарофосфатный фрагмент за счет присущей ей dRP лиазной (5'-дезоксирибофосфатлиазной) активности. При Polε/δ-зависимому пути репарации (II) после разрезания фосфодиэфирной связи нуклеазой APE1 полимеразы ε/δ синтезируют, начиная с AP-сайта, фрагмент цепи ДНК длиной от 2 до 10 нуклеотидов, вытесняя при этом исходную цепь ДНК с 5'-концевым сахарофосфатным остатком. Вытесненная цепь затем удаляется флэп-эндонуклеазой FEN1 (адаптировано из [54])

цессе репликации вместо тимина [49]. Сам по себе урацил не является мутагенной заменой, однако влияет на сродство транскрипционных факторов и других регуляторных белков к

ДНК. С помощью механизма эксцизионной репарации оснований устраняются продукты окислительного повреждения ДНК как эндогенного, так и экзогенного происхождения, в том числе и индуцируемые ультрафиолетом либо в результате прямого фотоокисления, либо по свободнорадикальному типу [49, 51—54]. К ним относятся различные пиримидиновые гидраты, в основном тиминовые гликоли и мутагенные производные цитозина, а также крайне токсичные продукты окислительного повреждения пуриновых оснований FapyA, FapyG, мутагенный 8-охоG и др. По описанному механизму удаляются из генома также алкилированные основания, среди которых наибольшую опасность для клетки представляет 3'-метиладенин, ведущий к остановке репликации. Кроме того, BER является и одним из механизмов репарации губительных для клетки одноцепочечных разрывов ДНК в ее геноме [48, 51, 52].

Специфичные к циклобутановым димерам гликозилазы и эндонуклеазы найдены у бактерий и бактериофагов и, вероятно, широко используются ими для репарации данных повреждений [3, 40]. Эукариотические УФ-эндонуклеазы, узнающие CPD и (6—4) фотопродукты и вносящие специфичный для BER разрыв в фосфодиэфирную связь непосредственно в 5'-положении к поврежденным основаниям, достоверно показаны лишь для дрожжей [82]. У животных и растений они не обнаружены. Имеется лишь несколько сообщений о существовании эндонуклеазных активностей, специфичных к облученной ДНК в экстрактах растений табака и салата [83, 84]. Однако эти нуклеазы не были охарактеризованы и не были установлены повреждения ДНК, к которым они были бы специфичны.

Поиск в геноме арабидопсиса последовательностей, близких известным последовательностям генов про- и эукариотических репаративных белков (Arabidopsis Genome Initiative, 2000), обнаружил у растения наличие большинства типичных для эукариот гликозилаз. Практически такие же результаты были получены при анализе генома представителя класса однодольных — сахарного тростника [85]. Эти данные свидетельствуют об эволюционном консерватизме механизма BER и его схожести

не только между высшими растениями, но и между растениями и животными.

Отсутствие у растений эндонуклеаз, обладающих сродством к CPD и пиримидин(6—4)пиримидонам, и наличие гликозилазных активностей предполагает, что субстратами для BER у растений являются те же повреждения ДНК, что и у животных.

Вывод прямо подтверждается клонированием генов гликозилаз растительного происхождения, специфичных к главным типам повреждений клеточной ДНК, узнаваемых BER, и исследованием продуктов их экспрессии. Отсубо и соавт. [86], а позже Гао и Мэрфи [87] клонировали из арабидопсиса кДНК аналога гена бактериальной формамидопиримидингликозилазы (FPG) *Atfpg1* и *Atfpg2*. У *E. coli* энзим FPG направлен прежде всего на устранение из генома по механизму BER мутагенного основания 8-охоG, представляющего особую опасность для клетки из-за его способности спариваться с аденином и таким образом приводить к трансверсиям G:C → T:A. Фермент специфичен к широкому кругу модифицированных пуринов и помимо 8-охоG способен узнавать ФаруG, ФаруA и 8-гидроксиаденин. Продукты клонированного в экспрессирующем векторе pET28 гена *Atfpg*, полученные в *E. coli*, расщепляли *in vitro* меченые флюоресцентном синтетические олигонуклеотиды, содержащие 8-охоG, и проявляли лиазную активность, характерную для бактериальных FPG гликозилаз. Авторами было показано также, что разные кДНК клонированного гена *Atfpg* являются результатом альтернативного сплайсинга единого предшественника мРНК. Образование альтернативных форм фермента из единственной структурной последовательности является общим явлением среди генов, принимающих участие в защите ДНК млекопитающих от окислительного повреждения свободными радикалами.

Другим найденным геном у арабидопсиса, продукт которого способен удалять 8-охоG и другие окисленные пурины из ДНК как *in vivo*, так и *in vitro*, является *OGG1* [88]. Он представляет собой функциональный, но не структурный эукариотический гомолог бактериального гена *mutM*. Клонированный в экспрессирующем векторе и трансформированный в мутант-

ный по генам *mutM* и *mutY* штамм *E. coli*, ген *AtOGG* снижал уровень спонтанных мутаций последнего, что предполагает его функциональность в растении.

Кроме гена *Atfpg*, клонированы гены арабидопсиса *aMAG* и *AtNTH1*, кодирующие другие аналоги бактериальных эндонуклеаз BER: 3'-метиладенингликозилазу и эндонуклеазу III [89—91]. Ген *aMAG* был клонирован на основании его способности комплементировать чувствительные к метилметансульфонату (MMS) мутанты *E. coli*, дефектные по гену *MAG*. У *E. coli* нуклеаза *MAG* специфично удаляет неинформативное повреждение ДНК — 3'-метиладенин. Это модифицированное основание действует как блок репликации и соответственно является токсичным или летальным для клетки. Недавно было обнаружено, что 3'-метиладенингликозилазы бактерий и животных имеют более широкий спектр действия, включающий алкилированные пиримидины и окисленные основания. Показано также, что регуляция гена дрожжевого аналога *MAG* чувствительна к ультрафиолету и ряду других агентов, повреждающих ДНК [89]. Поэтому возможно, что данный клонированный растительный ген принимает участие в детоксификации редких УФ-повреждений типа гликолей или пуриновых производных. В растении ген преимущественно экспрессируется в меристематических тканях и существен для эмбрионального развития растений.

Клонированная кДНК гена *AtNTH1* кодирует белок, близкий по аминокислотной последовательности к одному из ключевых компонентов BER *E. coli* — эндонуклеазе III и ее эукариотическим гомологам [91]. На синтетических ДНК-субстратах было показано, что *AtNTH1* представляет собой гликозилазу, специфичную, как и фермент *E. coli*, ко многим тиминовым производным, включая мочевину и тиминовые гликоли. Белок обладает также и лиазной активностью. Анализ с помощью обратной транскрипции и последующей ПЦР-амплификации (reverse transcription-PCR, RT-PCR) выявил мРНК изучаемого гена практически во всех исследованных тканях. Широкий спектр экспрессии *AtNTH1* предполагает, что репарационная активность кодируемого им фермента требуется не только для предотвращения

мутагенных эффектов в активно делящихся клетках, но и для снижения цитотоксичного воздействия на процессы транскрипции в растениях.

BER играет крайне важную роль в сохранении постоянства генома живых организмов, поскольку это основной способ удаления окисленных и алкилированных оснований из клеточной ДНК. Нокаут-мутации генов, продукты которых вовлечены в поздние стадии репаративного процесса у мышей (*Polβ*, *XRCC1*, ДНК-лигаза I), эмбрионально летальны. Мутации же по отдельным гликозилазам не влияют на развитие животных [24]. Это предполагает важность самого механизма BER, а не отдельных эндонуклеаз, функцию которых могут брать на себя другие защитные системы, в частности NER.

В геноме растений найдены все ключевые ферменты эксцизионной репарации оснований, за исключением *Polβ* [14, 23, 24, 85]. Ее роль в растительных клетках, по всей видимости, принадлежит полимеразе λ , открытой в последние годы у млекопитающих и растений и относящейся к тому же X-семейству полимераз, что и *Polβ*. Совсем недавно растительная кДНК *Polλ* клонирована из арабидопсиса [92]. Детальное исследование структурных и функциональных свойств фермента показало, что он, как и *Polβ*, является непротрансферной полимеразой и обладает присущей *Polβ* фосфодиэстеразной (dRP-лиазной) активностью, необходимой для осуществления репаративной функции. Анализ экспрессии гена *OsPolλ* обнаружил ее связь с пролиферирующими тканями. Наиболее высокое содержание мРНК полимеразы было выявлено в меристематических тканях корней и молодых листьев, а также в тканях, подлежащих мейозу. Необходимость в ферменте в активно реплицируемых тканях, а также возрастание его количества после экспозиции растений к ультрафиолету и их обработки алкилирующим агентом метилметансульфонатом, тоже показанных авторами, предполагают, что *OsPolλ* является репаративной полимеразой. Отсутствие у растений других родственных *Polβ* полимераз делает этот фермент наиболее вероятным кандидатом на роль основной полимеразы BER.

В противоположность BER, специфичной к определенному виду повреждений, механизм

эксцизионной репарации нуклеотидов более универсален. Репарационный комплекс, по видимому, может узнавать весьма широкий спектр повреждений ДНК, начиная от небольших, незначительно нарушающих структуру нуклеиновых кислот, и заканчивая огромными аддуктами, такими как (6—4) фотопродукты. Кроме того, NER совместно с гомологичной рекомбинацией является и одним из механизмов репарации внутрицепочечных и межцепочечных сшивок в геномной ДНК. Другим отличием NER от BER является то, что в процессе скоординированного действия входящих в репаративный комплекс ферментов (нуклеазы, хеликазы, полимеразы, лигазы) повреждения удаляются в виде олигонуклеотидов, а пробел в цепи ДНК при помощи репаративного синтеза заполняется репликативными полимеразой с использованием неповрежденной цепи в дуплексе как матрицы (рис. 2).

Механизм эксцизионной репарации нуклеотидов обнаружен у всех исследованных организмов, включая человека [21, 51—54]. У млекопитающих это единственный способ удаления CPD и пиримидин(6—4)пиримидиновых продуктов из генома. Нарушение этого пути у человека ведет к тяжелому заболеванию — пигментной ксеродерме (*xeroderma pigmentosum*, XP). Лица, страдающие XP, подвержены риску заболеть раком кожи в тысячу раз большему, чем нормальные индивиды. В группе XP насчитывается 7 генов XPA — XPG и все они в той или иной степени вовлечены в NER. У организмов, обладающих функциональными фотолиазами, NER, по всей видимости, является второстепенным путем удаления основных повреждений ДНК, вызываемых ультрафиолетом. Скорее он существен для репарации различных редких фотохимических модификаций оснований и продуктов их окисления свободными радикалами [51].

Наличие эксцизионной репарации нуклеотидов у растений показано комбинированными генетическими и биохимическими исследованиями [14, 21, 40]. В более ранних работах на облученных ультрафиолетом протопластах и суспензионных культурах клеток с помощью гидролиза клеточной ДНК и хроматографического анализа полученных продуктов было продемонстрировано исчезновение пиримидино-

вых димеров в ядерных фракциях и появление их в цитозоле [93]. Было установлено, что степень использования механизма темновой репарации очень широко варьирует между видами растений. Репарация очень эффективна в протопластах и суспензионной культуре клеток моркови, петрушки, табака и крайне низкая в клетках сои. Использование мутантных растений, дефектных в репарации отдельных видов УФ-повреждений ДНК, и применение более чувствительных методов анализа, позволяющих количественно оценить вклад каждого из фотопродуктов в общий баланс фотоповреждений ДНК ультрафиолетом, явилось новым этапом в исследовании защитных реакций растений в ответ на УФ-облучение. С помощью антител, специфичных к каждому виду повреждений, были продемонстрированы высокий уровень эксцизионной репарации (6—4) фотоаддуктов и отсутствие репарации пиримидиновых димеров циклобутанового типа в пятидневных проростках арабидопсиса [40]. В проростках люцерны более высокий уровень удаления был характерен для циклобутановых димеров [14, 40, 67].

В настоящее время исследования по изучению механизма эксцизионной репарации нуклеотидов у растений сконцентрированы в основном на арабидопсисе ввиду преимуществ данного растения как объекта исследований из-за его небольшого полностью секвенированного генома и короткого жизненного цикла. Они направлены на получение мутантных линий растений, выявление и клонирование генов, являющихся частью репарационных комплексов, их секвенирование и исследование кодируемых ими продуктов в гетерологичных системах. Большинство генов, требуемых для NER у микроорганизмов, дрожжей и млекопитающих, были идентифицированы и изучены благодаря такому подходу. Существует явная гомология между генами NER дрожжей и животных. У человека во все этапы процесса эксцизионной репарации нуклеотидов вовлечено более десятка основных факторов и значительно большее количество вспомогательных [94]. Не намного меньше их количество и у дрожжей.

Для определения числа генов, требуемых для темновой репарации, и исследования их субстрат-специфичности с помощью хими-

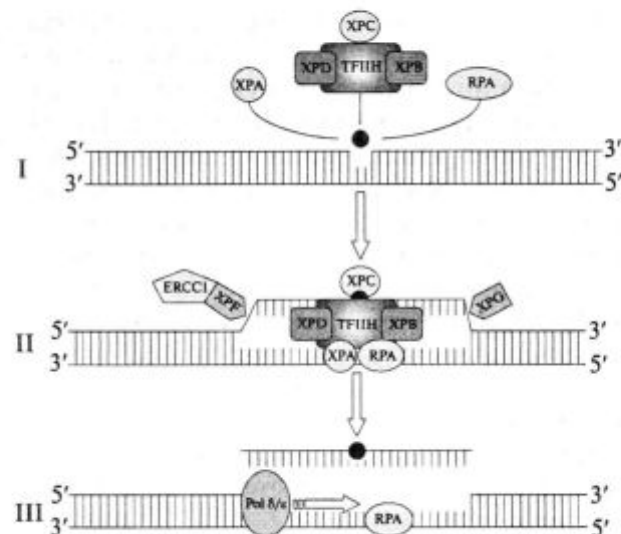


Рис. 2. Механизм эксцизионной репарации нуклеотидов у человека. (I) Эксцизионный процесс начинается с узнавания нарушения структуры ДНК репарационными факторами RPA, XPA или XPC-TFIIH, кооперативно формирующих затем на поврежденных сайтах инцизионные репаративные комплексы. (II) После верификации повреждения входящие в состав транскрипционного фактора TFIIH хеликазы XPB и XPD локально расплетают двойную спираль ДНК в поврежденном участке, а присоединяющиеся к репаративному комплексу эндонуклеазы XPG и XPF-ERCC1 вырезают фрагмент цепи ДНК, содержащий поврежденные основания. (III) Исходная структура ДНК восстанавливается матричным синтезом репликативными полимеразми Polδ и Polε (адаптировано из [54])

ческого мутагенеза был получен ряд мутантов арабидопсиса, дефектных в репарации пиримидиновых димеров и проявляющих чувствительный к ультрафиолету фенотип [19, 20, 95, 96]. Часть из них была определена как мутанты по NER. Генетический анализ позволил идентифицировать четыре комплементационные группы *UVR1*, *UVR5*, *UVR7* и *UVR1*, требуемые для механизма эксцизионной репарации димерных продуктов у растений. Авторами было определено также, что часть УФ-мутантов по NER проявляет чувствительный фенотип и к гамма-радиации. Полученные результаты совпадают с данными о широкой субстрат-специфичности механизмов эксцизионной репарации нуклеотидов у дрожжей и млекопитающих и их участии в процессах рекомбинационной репарации [51].

Имеющиеся к настоящему времени данные согласуются с наличием у растений механизма эксцизионного удаления нуклеотидов и его схожести с механизмами NER у эукариот [14, 23, 24, 97]. Поиск в базах данных на наличие в геноме растений последовательностей, родственных или близких последовательностям генов млекопитающих, принимающих участие в репарации повреждений клеточной ДНК по механизму NER, обнаружил наличие вероятных гомологов большинства репаративных генов в их геноме. Последовательности многих из них клонированы [98—110].

Так, три исследовательские группы независимо друг от друга одновременно сообщили о клонировании гена *UVH1/AtRAD1*, который комплементирует *uvh1* мутант арабидопсиса, дефектный по эксцизионной репарации димерных фотопродуктов [98—100]. Кодированный данным геном полипептид оказался гомологом белков Rad1 *S. cerevisiae* и XPF человека, являющихся компонентами эндонуклеазы, которая принимает участие в репарации поврежденной ДНК по механизму NER. У человека XPF в комплексе с белком ERCC1 отвечает за эндонуклеолитическую инцизию цепи ДНК с 5'-стороны от повреждения в ходе репаративного процесса. Единственная замена гуанинового остатка на адениновый в пятом интроне последовательности гена *UVH1* в *uvh1* мутанте привела к образованию нового сайта сплайсинга в предшествующем мРНК, сдвигу рамки считывания и появлению стоп-кодона в ее последовательности. Введенный в составе экспрессируемой плазмиды рREP1 в дефектный по данному гену мутантный штамм дрожжей *Schizosaccharomyces pombe*, ген *UVH1* восстанавливал его резистентность к УФ. Используя олигонуклеотидные праймеры к последовательностям мРНК генов *UVH1*, *UVR2* (CPD фотолиаза) и *UVR3* (6—4) фотолиаза, авторы с помощью RT-PCR показали, что гены *UVH1* и *UVR2* максимально экспрессируются в цветочных почках и меристемных тканях, тогда как экспрессия гена *UVR3* в данных растительных локусах менее выражена. Кроме того, в отличие от *UVR2* и *UVR3*, экспрессия *UVH1* была обнаружена и в корнях растений.

В ходе дальнейших исследований было показано, что продукт гена *UVH1/AtRAD1*, как и его дрожжевой аналог из *S. cerevisiae*, принима-

ет дополнительно к NER участие в гомологичной рекомбинации, где его функция заключается в удалении неспаренных одноцепочечных концов рекомбинируемых ДНК, а также, по-видимому, в репарации поврежденных оснований ДНК по механизму BER [101, 102].

Растительный ген другого компонента 5'-эндонуклеазы NER, гомолог генов *ERCC1* человека и *RAD10* дрожжей, клонирован из лилий [103]. Трансфекция растительного гена *ERCC1* в дефектную по данному гену клеточную линию СНО восстанавливала резистентность трансформированных клеток к ДНК-сшивающему агенту митомицину С, продукты которого являются субстратом NER. Авторами было продемонстрировано также, что растительный гомолог дрожжевого Rad10 представлен в геноме многих таксономически отдаленных растений, имеет широкую субстратную специфичность и является, как и у млекопитающих, обязательным компонентом митотической рекомбинации. На чувствительных к УФ *atercc* T-инсерционных мутантах арабидопсиса, несущих в хромосоме перекрывающиеся части маркерного гена β-глюкуронидазы (*GUS*) в прямой и обратной ориентации, было установлено, что *AtErcc1* вовлечен и во внутрихромосомную гомологичную рекомбинацию с использованием механизмов отжига одной цепи ДНК (single-strand annealing, SSA) и кроссинговера [104]. Что важно, мутантные растения арабидопсиса по гену *ERCC1*, в отличие от эмбрионально летальных мутантов млекопитающих, в отсутствие повреждающих агентов нормально развиваются и неотличимы от обычных растений [105]. Это дает возможность исследования в растениях функции *ERCC1* генов млекопитающих.

Начальные работы по клонированию *UVH1/AtRAD1*, *AtERCC1* [98—100, 103] являются одними из первых экспериментальных исследований, прямо установивших наличие NER у растений. Стало очевидным, что функции белков, являющихся компонентами механизма эксцизионной репарации нуклеотидов, законсервированы в процессе эволюции, а сами механизмы репарации у всех эукариот, в том числе и растений, схожи между собой. Вывод подтверждался работой Стурма и Лингарда [106]. Клонированные ими гены моркови

DCR23-1 и *DCR23-2*, гомологи гена фактора сборки репарационных комплексов дрожжей *RAD23*, комплементировали мутантные по данному гену штаммы последних.

У человека устранение повреждений клеточной ДНК по механизму NER осуществляется в несколько стадий последовательным действием шести основных репарационных факторов — XPA, RPA, XPC, TFIIH, XPG и XPF-ERCC1, состоящих в общей сложности из 15 полипептидов. Вначале поврежденные основания узнаются факторами XPA, RPA и XPC-TFIIH, которые формируют в этих сайтах инцизионные репаративные комплексы. Затем входящие в транскрипционный фактор TFIIH хеликазы XPB и XPD расплетают двойную спираль ДНК в поврежденном участке, а эндонуклеазы XPG и XPF-ERCC1, присоединяющиеся к репаративному комплексу на последнем этапе, разрезают 6 ± 3 и 20 ± 5 фосфодиэфирные связи с 3'- и 5'-сторон от повреждения соответственно. Вследствие такой совместной активности означенных ферментов в репарационном комплексе из двойной спирали ДНК удаляется фрагмент длиной от 24 до 32 нуклеотидов [51, 53, 54, 80]. На данное время гены этих основных компонентов NER обнаружены в геноме растений, и часть из них клонирована [107—110].

Растительный гомолог гена *XPG* человека и *RAD2* дрожжей *UVH3* идентифицирован в арабидопсисе как ген, мутация в котором определяет чувствительный к ультрафиолету фенотип растения *uvh3*, характеризующийся задержкой роста и преждевременным старением [107]. Найденная мутация являет собой замену одного основания G на A в 15-м экзоне гена, что вызвало появление стоп-кодона на матрице и образование дефектных мРНК, трансляция которых не дает полноценного белка. Трансформированный в гомозиготную линию арабидопсиса *uvh3^{-/-}*, функциональный ген *UVH3* восстанавливал ее резистентность к ультрафиолету и нивелировал мутантный фенотип растения. Кроме того, ген дикого типа комплементировал чувствительность мутантных растений к перекиси водорода, что указывает на причастность его продукта к BER, возможно, как и у человека, на стадии инициации этого репаративного механизма.

Рибейро и соавт. [108] клонировали ген арабидопсиса *araXPB*, продукт которого на 50 % идентичен 3'-хеликазам человека и дрожжей — XPB и Rad25. В результате структурных исследований было установлено, что кодируемый *araXPB* белок содержит все функциональные домены, характерные для его эукариотических гомологов: сигналы ядерной локализации, ДНК-связывающий участок, а также хеликазный мотив. Было показано, что геном растения в отличие от генома животных имеет две копии гена *XPB*. Какая функциональная разница между этими паралогами, пока не выяснено. У человека хеликаза XPB является компонентом транскрипционного фактора TFIIH и, кроме NER, участвует в транскрипции. Коста и соавт. [109] исследовали роль одной из копий *XPB* арабидопсиса, названного ими *AtXPB1*. Они нашли, что трансформация *AtXPB1* в дефектный по гомологичному гену *RAD25* штамм дрожжей *S. cerevisiae* частично восстанавливает резистентность последнего к УФ, а T-инсерционные гомозиготные мутанты арабидопсиса *atxpb^{-/-}* чувствительны к MMS. Эти данные согласуются с вовлечением гена *AtXPB1* в репаративные механизмы и NER, и BER.

Вслед за геном 3'-хеликазы арабидопсиса XPB Лиу и соавт. [110] был клонирован и ген 5'-хеликазы растения *AtXPD*. Он на 57 и 50 % идентичен соответствующим генам хеликаз человека *XPD* и дрожжей *RAD3* и содержит все присущие этим белкам функциональные домены. Было установлено, что мутантный фенотип полученных ранее чувствительных к УФ-С и УФ-В мутантов арабидопсиса *uvh6* является следствием миссенс-мутации в структурной области гена, повлекшей за собой замену глицина на глутамин в консервативном домене хеликазы и ее частичную инактивацию. Трансформация *AtXPD* в мутантные растения *uvh6* супрессировала их чувствительность к облучению ультрафиолетом, доказывая тем самым идентичность генов *AtXPD* и *UVH6*. Функциональные тесты показали, что продукты гена *AtXPD/UVH6* необходимы для репарации (6—4)фотопроизводных и существенны для роста и развития растений. Вследствие этого гомозиготные по данному гену T-инсерционные мутанты летальны.

Рассмотренный репаративный механизм является основным путем NER у низших и высших эукариот (global genome geraration, GGR). С его помощью осуществляется репарация большей части их генома. Для устранения повреждений в жизненно важных транскрипционно активных участках генома эукариотические организмы используют особый механизм NER, требующий участия специализированных белков CSA и CSB (transcription coupled repair, TCR) [111]. Мутации в генах этих белков вызывают у человека тяжелое наследственное заболевание — синдром Кокейна, одним из проявлений которого является повышенная чувствительность пациентов к ультрафиолету. Механизм TCR впервые был установлен на основании того факта, что поврежденные основания в транскрибируемых последовательностях активных генов репарируются намного быстрее, чем в последовательностях репрессированных генов. Одной из причин такой эффективности может быть то, что сам РНК-полимеразный комплекс является фактором узнавания повреждений в структуре ДНК [112]. Согласно представлениям о механизме TCR РНК-полимеразы II, наталкиваясь в процессе транскрипции на повреждение матрицы, связывается с белками CSA и CSB, которые обеспечивают быструю локализацию на поврежденном участке ферментов NER и его репарацию [53, 54, 111, 112].

Имеется ли данный сопряженный с транскрипцией механизм NER у растений, еще неясно. Гены гомологов белков CSA и CSB млекопитающих найдены в геноме арабидопсиса, однако функциональны ли они и какую роль выполняют кодируемые этими генами белки в растении, неизвестно [23].

Таким образом, имеющиеся в настоящее время экспериментальные данные однозначно согласуются с наличием у растений эксцизионных репаративных механизмов, близких аналогичным механизмам млекопитающих. Исследование механизмов BER и NER у растений выявило, однако, и весьма существенные особенности этих репаративных путей, характерные только для растительных организмов. Анализ геномов арабидопсиса и сахарного тростника не обнаружил у них генов ряда ферментов эукариотических BER и NER,

в частности Pol β , Lig3 и некоторых компонентов транскрипционного фактора TFIIN. В то же время многие репаративные гены растений дублированы или имеются в большем количестве в их геноме по сравнению с генами животных. В арабидопсисе, например, обнаружено необычно большое количество генов гликозилаз как прокариотического, так и эукариотического происхождения, а также наличие копий гомологов генов *RAD23*, *XPB*, *RPA1*, *RPA2* и *XPE* [14, 23–25]. Показано также, что гомозиготные мутанты растений по некоторым репаративным генам жизнеспособны, тогда как соответствующие мутации у млекопитающих летальны для их носителей [24].

Толерирующие механизмы защиты ДНК растений от повреждения ультрафиолетом

Эксцизионные пути репарации, описанные выше, могут быть разделены на два шага: во-первых, модифицированное основание удаляется; во-вторых, неповрежденная сестринская цепь используется как матрица для заполнения образовавшегося пробела в репарируемой цепи ДНК. Эти пути репарации в основном безошибочны. В случае же, когда синтез ДНК в клетке происходит прежде, чем произойдет полная репарация повреждений, неинформативные основания или аддукты оснований (например, пиримидиновые димеры) будут действовать как блок репликации. Полимераза будет вновь нормально реинициировать синтез дочерней ДНК, оставляя незаполненную брешь напротив поврежденных оснований в материнской цепи. В результате не полностью синтезированная хромосома уже не будет являться полноценной матрицей.

Многие организмы преодолевают возникающие затруднения двумя путями — с помощью рекомбинационной репарации и с помощью специализированного механизма репликативного синтеза в обход повреждений (translesion synthesis, TLS), позволяющего низкоспецифичным, открытым в последние годы ДНК-полимеразам проходить поврежденные участки ДНК без прекращения репликации. Подобные механизмы в клетках прокариот и эукариот в основном являются источником генных мутаций и оперируют в целях выживаемости ор-

ганизмов в ущерб целостности их генома [113—115].

Репликативный синтез в обход повреждений. Механизм TLS вначале был изучен в *E. coli*. Он был реконструирован *in vitro* на поврежденной ДНК с индивидуальными очищенными белками [116]. Для эффективного прохождения полимеразой поврежденного участка нуклеиновой кислоты необходимы продукты генов *UmuC* и *UmuD*, активированный клеточный белок *RecA* (мультифункциональный белок, требуемый для регуляции SOS системы, генетической рекомбинации и мутагенеза в *E. coli*) и *SSB* белки, необходимые для поддержания матрицы в репликационном состоянии. Две молекулы протеолитически процессированных белков *UmuD* и одна молекула *UmuC* в виде комплекса $UmuD'_2C$ связываются с ДНК-полимеразой III и ослабляют ее корректирующие свойства, вследствие чего фермент приобретает способность продолжать репликативный синтез через поврежденные участки ДНК. Измененная полимераза включает преимущественно аденин в растущую цепь ДНК напротив любого неинформативного продукта повреждения в материнской цепи ДНК. Соответственно, в результате такого процесса индуцированные ультрафиолетом тиминовые димеры не будут мутагенами, тогда как содержащие цитозин димеры будут являться источником возникновения точечных мутаций. Из-за того, что УФ-радиация вызывает преимущественно образование пиримидиновых димеров, и из-за того, что продукты генов *UmuC* и *D* требуются для прохождения дипиримидинов полимеразой, штаммы *E. coli*, дефектные по этим генам, проявляют повышенную чувствительность к летальным эффектам УФ-излучения [36]. Нынешние исследования показывают, что комплекс $UmuD'_2C$ и сам является низкоспецифичной полимеразой (*PolV*), способной во взаимодействии с *RecA* осуществлять мутагенный синтез на поврежденных матрицах [117]. У *E. coli* данный репликативный механизм находится под контролем SOS-системы. Он индуцируется в клетках тогда, когда количество повреждений в ДНК превышает возможности обычных клеточных репарационных механизмов — фотореактивации и эксцизионной репарации.

Механизм репликативного синтеза ДНК в обход повреждений у эукариот сходен с процессом, наблюдаемым у *E. coli*. На клетках *S. cerevisiae* показано, что для эффективной репликации поврежденных участков ДНК, в том числе и тиминовых димеров необходим белок *Rev1* [118]. Он требуется для УФ-индуцированного мутагенеза и по последовательности сходен с *UmuC* полимеразой *E. coli*. Очищенный рекомбинантный белок *Rev1* в праймер/матрица зависимой реакции катализирует включение dCMP в апуриновые и апириимидиновые сайты ДНК, т.е. является неспецифичной полимеразой. В меньшей степени (10—20 %) фермент обладает способностью к неспецифическому включению dCMP напротив A, U и G. Дальнейшее удлинение процессированных *Rev1* праймеров осуществляется ДНК-полимеразой ζ , состоящей из белков *Rev3* и *Rev7* и также требуемой для УФ-индуцированного мутагенеза *S. cerevisiae* [119]. Даже в отсутствие *Rev1* *Pol* ζ способна процессировать пиримидиновые димеры и другие аддукты в ДНК, часто включая при этом ошибочные нуклеотиды. Подобный путь синтеза является мутагенным и отвечает за возникновение точечных мутаций в дрожжевом геноме.

Третьей низкоспецифичной полимеразой у дрожжей, родственной *UmuC* *E. coli*, является полимераза η , кодируемая геном *RAD30* [120, 121]. В противоположность *Rev1* *Pol* η в зависимости от матрицы реакции катализирует корректное включение всех четырех оснований в поврежденные участки ДНК, обеспечивая таким образом безошибочное копирование матрицы. Важной особенностью фермента является его способность эффективно преодолевать главные продукты УФ-повреждения клеточной ДНК *cis-syn* T-T и другие циклобутановые димеры аккуратным образом. Фермент в процессе синтеза новой цепи ДНК вставляет напротив сшитых оснований комплементарные им остатки, что предотвращает возникновение мутаций при последующих клеточных делениях. *Pol* η способна также процессировать и (6—4) фотопродукты, однако менее корректно [120].

Структурные и функциональные гомологи специализированных полимераз *UmuC* *E. coli* и дрожжевых *Rev1*, *Pol* ζ и *Pol* η найдены и у человека [113, 115]. Они характеризуются анало-

гичными или близкими свойствами с последними. Интересной в клиническом отношении человеческой ДНК-полимеразой в этом семействе является Pol η , кодируемая геном *hRAD30A* [122]. Нонсенс-мутации или мутации со сдвигом рамки считывания в данном гене ведут к возникновению одного из вариантов (XPV) наследственного заболевания человека — пигментной ксеродермы. Как и дрожжевой аналог, человеческая Pol η способна к эффективному процессированию *cis-syn* T-T димеров аккуратным образом. В отсутствие функциональной полимеразы синтез напротив повреждений в цепи ДНК у больных XP полностью осуществляется лишенной коррекционных свойств Pol ζ , что проявляется в повышенном мутировании генов и увеличении у индивидуумов риска заболеть раком.

Недавно открыт другой структурный, но не функциональный гомолог дрожжевого гена *RAD30—hRAD30B* [123]. Показано, что кодируемый данным геном белок hRAD30B представляет собой новую неспецифичную полимеразу, названную йота. Pol ι является непротранскрибирующим энзимом и лишена корректирующих свойств. Ее функция заключается в inserции нуклеотидов, часто ошибочных, напротив поврежденных оснований ДНК. При этом фермент узнает и пиримидин(6—4)пиримидиновые аддукты. На основании этого авторами была предложена модель репликативного синтеза в обход повреждений у млекопитающих, согласно которой он может осуществляться последовательным действием сначала полимеразы ι , а затем процессирующей полимеразы Pol ζ .

Механизм TLS с участием двух полимераз получил экспериментальное обоснование и является главным в современных воззрениях на спонтанный и индуцированный мутагенез у млекопитающих. Считается, что основным ферментом, ответственным за возникновение геномных мутаций, является Pol ζ . Экспериментально показано, что этот белковый комплекс в зависимости от повреждений может функционировать двумя путями. Его менее выраженной функцией является способность проводить с низкой эффективностью синтез ДНК в поврежденных участках, которые могут включать 6—4 T-T и *cis-syn* T-T фотопродукты. Основная же роль Pol ζ в механизме TLS —

удлинение некомплементарных матрице нуклеотидов, внедряемых в поврежденные участки inserционными полимеразми Pol η , Pol ι или Rev1 [124, 125]. Такая же роль, по-видимому, принадлежит и недавно открытой полимеразе Pol κ , гомологу PolIV *E. coli* [126]. Фермент не в состоянии эффективно проводить синтез на поврежденных участках ДНК, однако может удлинять 3'-концы нуклеотидов, вставленных в эти участки другими низкоспецифичными полимеразми [115, 126]. Показано также, что в процессе клеточного синтеза ДНК возможно взаимодействие Pol η и репликативных полимераз ϵ и δ [127].

У растений механизм синтеза в обход повреждения предсказан лишь в последние годы на основании биоинформационных исследований геномов арабидопсиса и риса [23, 96]. В геноме растений найдены все гомологи специализированных полимераз млекопитающих Pol η , Pol κ , Pol ζ и Rev1. Недавно Сакамото и соавт. [128] было показано, что T-инсерционные мутанты арабидопсиса по гену *AtREV3* чувствительны к УФ-В и γ -радиации, хотя их эксцизионные репаративные механизмы не были нарушены и у них сохранялась активность фототиаза. С помощью нозерн-гибридизации авторами было продемонстрировано, что ген эффективно экспрессируется во всех органах растения, включая и корни. Этими же авторами были получены и исследованы T-инсерционные мутанты арабидопсиса по генам *AtREV1* и *AtREV7* [129]. Как показал анализ, мутантные растения *rev1* и *rev7* проявляют повышенную чувствительность к УФ-В, а также ДНК-сшивающим агентам митомицину С и цисплатину. Эти данные свидетельствуют не только о наличии, но и функциональности механизма TLS у растений. Такой же вывод следует из результатов исследования экспрессии гена полимеразы κ в арабидопсисе [130]. В эксперименте промотор *AtPOL κ* был слит с последовательностью *GUS* гена, что дало возможность оценить его экспрессию в растении. Было показано, что гибридный ген находится под строгим клеточным контролем и экспрессируется во многих органах и тканях трансгенного растения.

Гомологичная рекомбинация. Гомологичная рекомбинация, по-видимому, является еще одним толерирующим механизмом, позволя-

ющим клетке продолжить репликацию и дальнейшее прохождение клеточного цикла при наличии нерепарированных повреждений геномной ДНК [40]. В отличие от механизма синтеза в обход повреждения, использующего специальные полимеразы для застройки бреши в дочерней цепи напротив поврежденных нуклеотидов, данный репаративный путь вовлекает гомологичные последовательности в качестве матрицы для синтеза комплементарных цепей в поврежденных участках ДНК. Как и в случае TLS, повреждение может остаться нерепарированным, однако клетка может его элиминировать в последующих раундах клеточного деления.

Гомологичная рекомбинация выполняет в клетке две важнейшие роли: обеспечивает генетическое разнообразие геномов вследствие обмена аллельными последовательностями между гомологичными родительскими хромосомами в мейозе (мейотическая рекомбинация) и отвечает за сохранение геномов при их передаче дочерним клеткам в митозе (митотическая или соматическая репаративная рекомбинация). Обе эти функции эволюционно скоординированы и осуществляются схожими механизмами. Генетически и биохимически эти механизмы близки между собой [21, 131].

Рекомбинационные репаративные пути обнаружены у всех изученных в достаточной степени про- и эукариотических организмов, в том числе и растений [131]. Они эволюционно консервативны и используются в основном для устранения губительных для клетки двухцепочечных разрывов хромосомной ДНК и восстановления целостности генома. Эти пути могут также использоваться и для репарации внутри- и межцепочечных сшивков двойной спирали и одноцепочечных пробелов в ее структуре [3, 51, 54].

Хотя двухцепочечные разрывы ДНК происходят значительно реже других повреждений ДНК, они являются наиболее опасными для клетки. Показано, что один нерепарированный разрыв дуплекса ДНК даже в незначительной части генома может быть летальным для клеток дрожжей. Разрывы двух цепей ДНК в клетке могут возникать в результате механического стресса в одноцепочечных участках макромолекул, в процессе инициации

кроссинговера в мейозе или под воздействием эндогенных и экзогенных факторов, таких как свободные радикалы, реакционные виды кислорода, ионизирующее излучение и химические вещества радиомиметики [14, 51, 55]. Источником разрывов могут быть и нерепарированные первичные повреждения хромосомной ДНК вследствие их конвертации в двухцепочечные разрывы в местах остановки полимераз.

Важность репарации такого рода повреждений ДНК в жизни организмов подчеркивается наличием у них второго независимого пути репарации двухцепочечных разрывов ДНК — негомологичной или нелегитимной рекомбинации (nongomologous end joining, NGEJ). При нелегитимной рекомбинации происходит прямое воссоединение разорванных концов хромосомной ДНК, не требующее гомологии. Это крайне мутагенный путь. Он может привести не только к хромосомным перестройкам, но и потере части хромосом [55, 132]. Репарация посредством гомологичной рекомбинации менее мутагенна. В процессе устранения повреждений по этому пути в качестве матрицы для репаративного синтеза используются либо гомологичные, либо близкие к ним последовательности из других участков генома. Если комплементарная последовательность получена из гомологичной области сестринской хроматиды, восстановленная цепь ДНК будет идентична исходной. Если же будут использованы схожие последовательности из этой же хромосомы или аллельной области гомологичной хромосомы и других мест генома, репарация будет сопровождаться мутациями как вследствие генной конверсии, так и в результате делеций, дупликаций или транслокаций [40, 133—135].

Оба репаративных механизма, по-видимому, неравнозначны. Вначале думалось, что микроорганизмы и дрожжи, организмы с небольшими компактными геномами, используют для репарации двойных разрывов ДНК преимущественно гомологичную рекомбинацию, тогда как высшие эукариоты, в том числе млекопитающие и растения, репарируют хромосомные разрывы почти исключительно посредством негомологичной рекомбинации. Эта точка зрения в некоторой степени изменилась в настоящее время. Стало ясно, что ре-

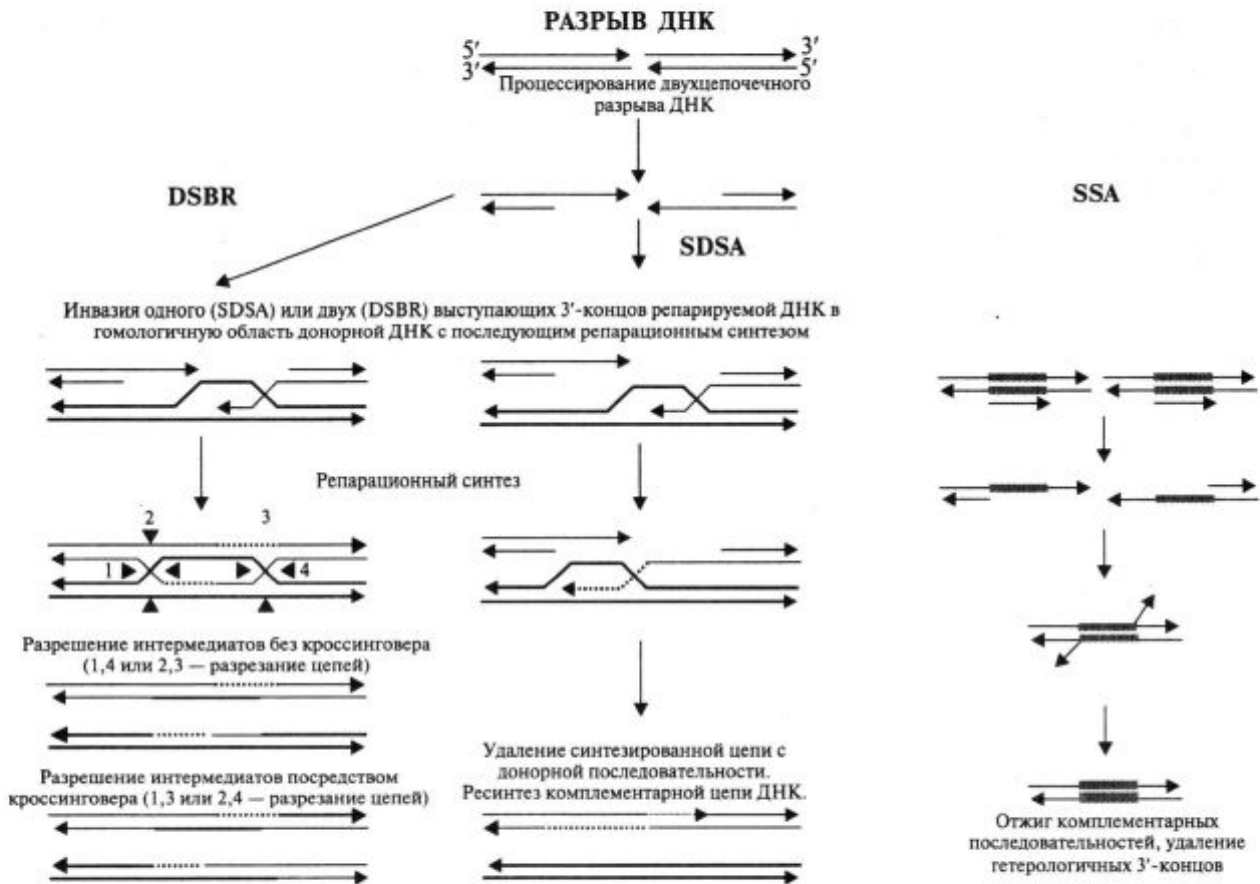


Рис. 3. Механизмы рекомбинационной репарации двухцепочечных разрывов ДНК у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. На первом этапе репарации происходит процессирование экзонуклеазным комплексом Mre11-Rad50-Xrs разрывов молекулы ДНК, заканчивающееся образованием выступающих одноцепочечных 3'-концов. По модели DSBR оба свободных 3'-конца поврежденной ДНК внедряются в гомологичную область донорной ДНК, направляя репаративный синтез своих цепей. В процессе репарации происходит ковалентное связывание однонаправленных цепей двух дуплексов и образование структур Холидея, разрешение которых может происходить с помощью кроссинговера или без него. Согласно модели SDSA один 3'-конец поврежденной ДНК внедряется в гомологичную область донорной ДНК, направляя репаративный синтез цепи. По окончании синтеза репарированная цепь смещается с гомологичной последовательности и отжигается к другой цепи своей ДНК, являясь матрицей для ее репарации. В соответствии с моделью SSA процессирование двухцепочечных разрывов ДНК продолжается до тех пор, пока не будут экспонированы гомологичные последовательности двух участков ДНК, которые затем отжигаются друг на друга. Неспаренные 3'-концы в рекомбинируемых участках удаляются нуклеазами (адаптировано из [135])

репарация посредством гомологичной рекомбинации важна в быстро делящихся клетках и существенна в S- и G₂-фазах клеточного цикла, когда становятся доступными в качестве матрицы для репаративного синтеза последовательности сестринских хромосом. Нелигитимная рекомбинация необходима больше для терминально дифференцированных тканей и, кроме того, требуется для объединения фрагментов ДНК в процессе V(D)J рекомбинации

при образовании иммуноглобулиновых генов [53].

Наши знания генетики и механизмов гомологичной рекомбинации у эукариот основаны главным образом на данных, полученных при изучении этих процессов у дрожжей [133, 135, 136]. У *Saccharomyces cerevisiae* за репаративный процесс отвечают белки эпистатической группы генов *RAD52*, из которых главная роль принадлежит Rad52, инициирующему вместе

с фактором репликации RPA рекомбинационный процесс, а также Rad51, гомологу рекомбиназы *E. coli* RecA, обеспечивающему поиск и обмен гомологичными последовательностями в клетках дрожжей. В процессе обмена принимают участие паралоги Rad51 — белки Rad55 и Rad57, стабилизирующие образуемый Rad51 нуклеофиламент. Мутанты *S. cerevisiae* по этим генам дефектны в мейотической и митотической рекомбинации. Для объяснения происхождения продуктов рекомбинации предложен ряд моделей, главные из которых базируются на механизме нуклеолитической деградации 5'-концов, разорванной ДНК белковым комплексом Mre11-Rad50-Xrs, который обладает экзонуклеазной активностью, и инвазии образовавшихся одноцепочечных 3'-концов молекулы в неповрежденную область гомологичного дуплекса ДНК с последующим их репаративным синтезом [135, 136]. Различие этих механизмов основано на способах разрешения образовавшихся интермедиатных структур (рис. 3).

Согласно классической модели репарации двухцепочечных разрывов ДНК (double-strand break repair model, DSBR) в процессе репаративного синтеза происходит ковалентное связывание однонаправленных цепей рекомбинируемых молекул ДНК с образованием структур Холлидея. Разрешение таких ковалентно связанных дуплексов в соответствии с моделью может осуществляться кроссинговером или без него. Данный механизм больше подходит для репарации разрывов хромосом при кроссинговере в мейозе, хотя, как показано, он может использоваться для репарации и в митотических клетках. В данном случае процесс будет крайне мутагенным, если в качестве матрицы для синтеза будут привлекаться неаллельные (эктопические) последовательности [133, 135, 136].

Этого недостатка лишена модель репарации, связанная со смещением репарируемой цепи с гомологичной матрицы, объединением ее со своей цепью и последующим заполнением пробела в комплементарной цепи ресинтезом уже на восстановленной последовательности (synthesis-dependent strand annealing model, SDSA). В качестве матрицы для репарации по предлагаемому механизму могут вов-

лекаться гомологичные последовательности сестринских хроматид, гомологичных хромосом или последовательности из других мест генома. Процесс не будет мутагенным, если будут использованы последовательности сестринских хроматид. Во всех других случаях он будет сопровождаться конверсией. Экспериментально доказано, что SDSA является основным механизмом митотической репарации у эукариот [21, 26, 135, 136].

Третий механизм гомологичной репарации SSA характерен для областей генома с тандемно повторяющимися последовательностями. Он всегда сопряжен с потерей генетической информации в результате делеций промежуточных участков ДНК между рекомбинируемыми последовательностями двойной спирали [134, 136].

Гомологи дрожжевых генов эпистатической группы *RAD52* найдены у прокариот, позвоночных и растений [131, 135, 137]. Кодированные ими белки структурно и функционально близки между собой, что указывает на консервативность *RAD51*-зависимого рекомбинационного репаративного пути. В геноме позвоночных в дополнение к гену Rad51 имеются пять генов, кодирующих родственные ему паралоги Rad51B/C/D, Xrcc2 и Xrcc3. На клеточных линиях и эмбрионах мышей показано, что их функция жизненно важна для млекопитающих. Все они вовлечены в мейотическую и митотическую рекомбинацию. Нарушение их функции ведет к хромосомной нестабильности и может привести к летальному исходу [138].

В геноме *Arabidopsis thaliana* найдены все гены подсемейства *RAD51*, имеющиеся у млекопитающих [138—141]. Некоторые гены растений, принадлежащих к этой группе, клонированы и частично исследованы [139, 140]. Показано, что гены белков подсемейства Rad51 в арабидопсисе индуцируются в S-фазе клеточного цикла и регулируются на всем его протяжении [139, 140]. Они экспрессируются в более высокой степени в репродуктивных тканях, особенно на ранних стадиях развития цветочных почек, а также в богатых на делящиеся клетки меристематических тканях. Их экспрессия индуцируется γ -радиацией. Эти данные прямо предполагают участие продуктов исследуемых генов в мейозе и репарации повреждений кле-

точной ДНК при ее репликации [138—141]. В двугибридных дрожжевых системах установлено, что белки подсемейства AtRad51 — AtRad51B/C/D, AtXrcc2 и AtXrcc3 в арабидопсисе образуют между собой те же комплексы, что и их гомологи у животных. Это предполагает и их близкую функцию в растительной клетке [138, 139]. В то же время на Т-инсерционных мутантах арабидопсиса обнаружено, что нокаут-мутации по генам этих белков, в отличие от млекопитающих, не летальны для растений [138].

Из других генов семейства *RAD52* клонирован ген *AtRAD50*. Показано, что кодируемый данным геном белок AtRad50 требуется для стабилизации хромосомных теломер и ему принадлежит важная роль в клеточном мейозе [142, 143]. Кроме того, установлено, что AtRad50 может образовывать комплексы с AtMre11 [144, 145].

В целом же генетические и молекулярно-биологические основы репаративной гомологичной рекомбинации у растений изучены еще недостаточно по сравнению с дрожжами и млекопитающими. Интенсивно проводимые до последнего времени исследования имели своей целью больше выяснение закономерностей интеграции в геном растений трансгенов и репарации двухцепочечных разрывов ДНК в их геноме, что мотивировалось потребностями генетической инженерии. Для исследования процессов рекомбинации были разработаны специальные экспериментальные системы с использованием трансгенных растений, несущих в своем геноме последовательности маркерных генов, репарация которых позволяет оценить частоту репаративных рекомбинационных событий в исследуемых тканях и изучить их механизм [131, 134]. С их помощью было определено, что в процесс соматической гомологичной рекомбинации растений могут вовлекаться гомологичные последовательности ДНК как сестринских хроматид, так и гомологичных хромосом, а также гомологичные или близкие к ним последовательности ДНК из других частей генома. На основании результатов анализа нуклеотидной последовательности рекомбинантов выяснилось, что репарация поврежденных генов у растений может осуществляться теми же механизмами, что и репарация у дрожжей, в основном SDSA и

SSA, сопровождаясь при этом конверсиями и делециями [134, 146—150]. Частота этих процессов, однако, очень низкая и равна одному событию на 10^4 всех случаев рекомбинационной репарации. Более высокая частота гомологичной рекомбинации возможна лишь в участках генома, содержащих рядом с сайтом рекомбинации множественные копии рекомбинируемых последовательностей (до трети всех случаев репарации) [148, 149].

Репарация УФ-повреждений клеточной ДНК с помощью гомологичной рекомбинации обнаружена у микроорганизмов, дрожжей, животных, включая человека, и растений [15, 151—155]. У растений использование гомологичной рекомбинации для репарации фотоповреждений генома у растений изучено крайне слабо. Все исследования в этом направлении на данное время ограничены лишь несколькими работами, выполненными на табаке и арабидопсисе.

Пухтой с соавт. [154], а также Риесом с соавт. [15, 155] был проведен анализ влияния УФ-С и повышенных доз УФ-В на частоту внутрихромосомной соматической рекомбинации в целых трансгенных растениях арабидопсиса и табака на протяжении всего их жизненного цикла. В качестве рекомбинационного маркера был использован расчлененный ген β -глюкуронидазы с перекрывающимися последовательностями, содержащийся в геноме растений. Восстановление функции гена, о чем можно было судить по гистохимической окраске *in situ*, служило доказательством случаев гомологичной рекомбинации. Было показано, что облучение молодых проростков УФ-В и УФ-С стимулирует рекомбинационные перестройки в различных органах растений [15, 154]. Частота рекомбинации зависела от фотосинтетически активной радиации [155] и увеличивалась после обработки растений ингибитором поли(АДФ-рибоза)-полимеразы (poly(ADP-ribose)polymerase, PARP), мультифункционального белка, принимающего участие в эксцизионной репарации по механизму BER в клетках млекопитающих [154, 156]. Имея сродство к никотиновой ДНК, PARP связывается с ней и таким образом препятствует нежелательным для клетки рекомбинационным процессам.

Было высказано предположение, что повышенная частота рекомбинационного восстановления функции *GUS* гена является следствием индукции механизма гомологичной рекомбинации для прямой репарации УФ-повреждений ДНК. Оно было подтверждено исследованием частоты рекомбинации в дефектных по CPD фотолиазе *uvr2-1* мутантах арабидопсиса при облучении их УФ-В [15, 155]. В мутантных линиях она была значительно выше, нежели в обычных *UVR2-1* растениях. С этим согласуются и результаты оценки уровня внутриклеточного содержания в арабидопсисе мРНК *AtRAD51*, ключевого гена гомологичной рекомбинации у дрожжей и млекопитающих. У растений, облучаемых ультрафиолетом, внутриклеточное содержание данной мРНК было повышено по сравнению с контрольными растениями [15, 155]. Обнаружилось также, что повышенная частота соматической рекомбинации может наследоваться и проявляться в потомстве рекомбиногенных растений.

Механизм индукции гомологичной рекомбинации у растений ультрафиолетом и сами механизмы репарации еще до конца не выяснены. Стимуляция *AtRad51* γ -радиацией и повышенный уровень мРНК *AtRad51* в облучаемом УФ-В арабидопсисе дают основание предполагать, что индукция механизма гомологичной рекомбинации для репарации УФ-повреждений ДНК в растениях может вызываться двухцепочечными разрывами в ее структуре. Такие разрывы могут образовываться как вторичные повреждения одноцепочечных разрывов, появляющихся в структуре ДНК при репарации тиминовых димеров и других фотопроизводных механизмами NER и BER. На это указывает и стимуляция соматической рекомбинации у растений алкилирующим агентом MMS, который метилирует основания ДНК [154]. Репарация таких повреждений в клетках эукариот тоже осуществляется по механизму BER. Возможно также, что стимуляция ультрафиолетом гомологичной рекомбинации у растений может быть и следствием транскрипционной активации различных защитных механизмов растений в процессе выработки их комплексного ответа на повышенный уровень УФ-излучения [131].

Недавно на гомозиготных и гемизиготных трансгенных растениях арабидопсиса показа-

но, что растения в процессе гомологичной рекомбинации могут использовать для репарации повреждений ДНК в соматических тканях после их обработки УФ-В, УФ-С, MMS и блеомицином последовательности сестринских и гомологичных хромосом [147]. При этом выбор клетками механизма рекомбинации, а также вклад сестринских и аллельных гомологичных последовательностей в репарацию, по-видимому, зависят от типа повреждений ДНК и геномной позиции рекомбиногенных субстратов. Как следует из экспериментов, основным следствием рекомбинационных путей является генная конверсия и в меньшей степени неравная реципрокная рекомбинация.

Повышенная частота соматической рекомбинации в арабидопсисе индуцируется не только ультрафиолетом, но также и другими стрессовыми факторами, в том числе и патогенами [131, 147, 157]. Возникающие при этом изменения в геномах соматических клеток вследствие рекомбинационных перестроек могут попасть в гаметы и в случае их полезности закрепиться в потомстве растений. Поэтому индукция гомологичной рекомбинации в ответ на воздействие различных внешних факторов является, по-видимому, одним из адаптивных механизмов растений к изменяющимся условиям окружающей среды.

Заключение

Постоянство генома является основным условием существования организмов как видов, так и отдельных индивидуумов. Целостность и неизменность нуклеотидного состава клеточной ДНК необходимы для адекватной транскрипции генов, кодирующих функциональные РНК, структурные и регуляторные белки, ферменты и отдельные субъединицы ферментных комплексов, требуемые для нормальной жизнедеятельности клетки, ее репликации и передачи клеткой генома последующим поколениям.

В то же время геномы всех живых существ на протяжении их жизни постоянно подвергаются воздействию различных физических и химических факторов окружающей среды природного и антропогенного происхождения, модифицирующих основания и повреждающих структуру ДНК либо прямо, либо посредством индуцируемых ими реакционных

видов кислорода. К этим факторам относятся ультрафиолетовая и γ -радиация, соли тяжелых металлов, канцерогены, бактериальные токсины и др. Большим источником окислительных повреждений клеточной ДНК эндогенного происхождения являются также свободные радикалы кислорода, образующиеся обычно в процессе обмена веществ в митохондриях, а у растений еще и вследствие фотосинтеза в хлоропластах. Свой вклад в эндогенные повреждения ДНК вносят и внутриклеточные алкилирующие агенты.

Повреждения геномной ДНК, вызываемые этими факторами, в большинстве своем являются цитотоксичными или генотоксичными для клетки. Будучи нерепарированными, они могут привести к дестабилизации генома, остановке клеточного цикла и даже смерти клетки. Они являются также и источником генных мутаций в организме. Чтобы выжить, все организмы должны обладать защитными механизмами, позволяющими устранить все повреждения в ДНК или, в худшем случае, нейтрализовать их токсичное воздействие на геном. Эти механизмы законсервированы в процессе эволюции и близки как между прокариотами, так и между самими эукариотическими организмами. Как следует из геномной последовательности арабидопсиса, растения обладают всеми защитными механизмами, характерными для других эукариот, и по набору репаративных белков более сходны с млекопитающими, нежели с другими животными. Функциональный анализ продуктов клонированных репаративных генов растений, а также исследование Т-инсерционных мутантов арабидопсиса по репаративным генам свидетельствуют о том, что и функционально репаративные механизмы растений и других эукариот близки между собой.

SUMMARY. Solar UV-B radiation is an environmental factor which damage and destabilize genomes. UV-B-induced DNA lesions have cytotoxic and genotoxic effects on the cells of pro- and eucaryotes including plants. In addition, such lesions can cause gene mutations in plants. The products of the damages of cellular DNA caused by UV are examined in the present review and plant reparative pathways including photoreactivation, base excision repair and nucleotide excision repair are analyzed. The review deals as well with the mechanisms of plant DNA damage tolerance which allow to reduce the toxic effects of UV-B radiation.

РЕЗЮМЕ. Одним з факторів, що пошкоджують та дестабілізують геноми, є УФ-В випромінювання Сонця. Пошкодження ДНК, які спричиняться УФ-В, є цитотоксичними та генотоксичними для клітин про- та еукаріот, включаючи і рослини. Крім того, ці пошкодження можуть бути і причиною виникнення генних мутацій в рослинах. В огляді розглянуто продукти пошкодження клітинної ДНК ультрафіолетом та проаналізовано репаративні шляхи, які є у рослин і використовуються ними для усунення цих пошкоджень: фотореактивація і ексцизійні механізми репарації основ та нуклеотидів. Розглядаються також толеруючі механізми, які дозволяють знизити токсичний ефект впливу ультрафіолету на рослини.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Rozema J., Van de Staaij, Bjorn L.O., Caldwell M. UV-B as an environmental factor in plant life: stress and regulation // Trends Ecol. Evol. — 1997. — 12. — P. 22—28.
2. Robberecht R. Environmental photobiology // The Science of Photobiology. — Plenum Publ. Corp. — 1989. — P. 135—154.
3. Sinha R.P., Hader D.-P. UV-induced damage and repair: a review // Photochem. Photobiol. Sci. — 2002. — 1. — P. 225—236.
4. Ananthaswamy H.N. Ultraviolet light as a carcinogen // Chemical Carcinogens and Anticarcinogens. — Oxford, 1997. — 12. — P. 255—279.
5. Jansen M.A.K., Gaba V., Greenberg B.M. Higher plants and UV-B radiation: balancing damage, repair and acclimation // Trends Plant Sci. — 1998. — 3. — P. 131—135.
6. Frohnmeyer H., Staiger D. Ultraviolet-B radiation-mediated responses in plants // Plant Physiol. — 2003. — 133. — P. 1420—1428.
7. Jordan B.R. The effects of ultraviolet-B radiation on plants: a molecular perspective // Adv. Bot. Res. — 1996. — 22. — P. 97—161.
8. Jansen M.A.K. Ultraviolet-B radiation effects on plants: induction of morphogenic responses // Physiol. Plant. — 2002. — 116. — P. 423—429.
9. Teramura A.H., Sullivan J.H. Effects of UV-B radiation on photosynthesis and growth of terrestrial plants // Photosynth. Res. — 1994. — 39. — P. 463—473.
10. Caldwell M.M., Ballare C.L., Bornman J.F., Flint S.D., Bjorn L.O., Teramura A.H., Kulandaivelu G., Tevini M. Terrestrial ecosystems, increased solar ultraviolet radiation and interactions with other climatic change factor // Photochem. Photobiol. Sci. — 2003. — 2. — P. 29—38.
11. Barnes P.W., Flint S.D., Caldwell H.M. Morphological responses of crop and weed species of different growth forms to ultraviolet-B radiation // Amer. J. Bot. — 1990. — 77. — P. 1354—1360.

12. Stapleton A.E., Valbot V. Flavonoids can protect maize DNA from the induction of ultraviolet-radiation damage // *Plant Physiol.* — 1994. — **105**. — P. 881–889.
13. Mazza C.A., Boccalandro H.E., Giordano C.V., Battista D., Scopel A.L., Ballare C.L. Functional significance and induction by solar radiation of ultraviolet-absorbing sunscreens in field-grown soybean crops // *Plant Physiol.* — 2000. — **122**. — P. 117–125.
14. Tuteja N., Singh B.M., Misra M.C., Bhalla P.L., Tuteja R. Molecular mechanisms of DNA damage and repair: progress in plants // *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* — 2001. — **36**. — P. 337–397.
15. Ries G., Heller W., Puchta H., Sandermann H., Seldlitz H., Hohn B. Elevated UV-B radiation reduces genome stability in plants // *Nature*. — 2000. — **406**. — P. 98–101.
16. Stapleton A.E. Ultraviolet radiation and plants: burning questions // *Plant Cell*. — 1992. — **4**. — P. 1353–1358.
17. Giordano C.V., Calatro A., Puntarulo S., Ballare C.L. The inhibitory effects of UV-B radiation (280–315 nm) on *Gunnera magellanica* growth correlate with increased DNA damage but not with oxidative damage to lipids // *Plant Cell Env.* — 2004. — **27**. — P. 1415–1423.
18. Bieza K., Luis R. An *Arabidopsis* mutant tolerant to lethal ultraviolet-B levels shows constitutively elevated accumulation of flavonoids and other phenolics // *Plant Physiol.* — 2001. — **126**. — P. 1103–1115.
19. Landry G.L., Stapleton A.E., Lim J., Yiffman P., Hays J.B., Walbot V., Last R.L. An *Arabidopsis* photolyase mutant is hypersensitive to ultraviolet-B radiation // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. — 1997. — **94**. — P. 328–332.
20. Jiang C.-Z., Yen C.-N., Kronin K., Mitchell D., Britt A.B. UV-B and gamma-radiation sensitive mutants of *Arabidopsis thaliana* // *Genetics*. — 1997. — **147**. — P. 1401–1409.
21. Bray C.M., West C.E. DNA repair mechanisms in plants: crucial sensors and effectors for the maintenance of genome integrity // *New Phytologist*. — 2005. — **168**. — P. 511–528.
22. Tanaka A., Sakamoto A., Ishigaki Y., Nikaido O., Sun G., Hase Y., Shikazono N., Tano S., Watanabe H. An ultraviolet-B-resistant mutant with enhanced DNA repair in *Arabidopsis* // *Plant Physiol.* — 2002. — **129** — P. 64–71.
23. Arabidopsis genome initiative, analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana* // *Nature*. — 2000. — **408**. — P. 796–815.
24. Britt A. Repair of damaged bases // *The Arabidopsis Book*. — Rockville : Amer. Soc. Plant Biol. — 2002.
25. Hays J.B. *Arabidopsis thaliana*, a versatile model system for study of eucaryotic genome-maintenance functions // *DNA Rep.* — 2002. — **1**. — P. 579–600.
26. Britt A.B., May G.D. Re-engineering plant gene targeting // *Trends Plant Sci.* — 2003. — **8**. — P. 90–95.
27. Mitchell D.L., Narin R.S. The biology of the (6–4) photoproduct // *Photochem. Photobiol.* — 1989. — **49**. — P. 805–819.
28. Ravanat J.L., Douki T., Cadet J. Direct and indirect effects of UV radiation on DNA and its components // *J. Photochem. Photobiol. B*. — 2001. — **63**. — P. 88–102.
29. Douki T., Cadet J. Individual determination of the yield of the main-UV induced dimeric pyrimidine photoproducts in DNA suggest a high mutagenicity of CC photolesions // *Biochemistry*. — 2001. — **40**. — P. 2495–2501.
30. Mitchell D.L., Rosenstein B.S. The use of specific radioimmunoassays to determine action spectra for the photolysis of (6–4) photoproducts // *Photochem. Photobiol.* — 1987. — **45**. — P. 781–786.
31. Rochette P.J., Therrien J.P., Drouin R., Perdiz D., Bastien N., Drobetsky E.A., Sage E. UVA-induced cyclobutane pyrimidine dimers form predominantly at thymine-thymine dipyrimidines and correlate with the mutation spectrum in rodent cells // *Nucl. Acids Res.* — 2003. — **31**. — P. 2786–2794.
32. Lymichev V. Unusual conformation of (dA)n-(dT)n-tracts as revealed by cyclobutane thymine-thymine dimer formation // *Nucl. Acids Res.* — 1991. — **19**. — P. 4491–4496.
33. Toma F. Light and dark in chromatin repair: repair of UV-induced DNA lesions by photolyase and nucleotide excision repair // *EMBO J.* — 1999. — **18**. — P. 6585–6598.
34. Pfeifer G.P., Drouin R., Riggs A.D., Holmquist G.P. Binding of transcription factors creates hot spots for UV photoproducts in vivo // *Mol. Cell. Biol.* — 1992. — **12**. — P. 1798–1803.
35. Aboussekhra A., Thoma F. TATA-binding protein promotes the selective formation of UV-induced (6–4)-photoproducts and modulates DNA repair in the TATA box // *EMBO J.* — 1999. — **18**. — P. 433–443.
36. Britt A.B. Repair of DNA damage induced by ultraviolet radiation // *Plant Physiol.* — 1995. — **108**. — P. 891–896.
37. Besaratinia A., Synold T.V., Chen H.-H., Chang C., Xi B., Riggs A.D., Pfeifer G.P. DNA lesions induced by UVA1 and B radiation in human cells : Comparative analysis in the overall genome and in the p53 tumor suppressor gene // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. — 2005. — **102**. — P. 10058–10063.
38. Quate F.E., Sutherland B.M., Sutherland J.C. Action spectrum for DNA damage in alfalfa lowers predicted impact of ozone depletion // *Nature*. — 1992. — **358**. — P. 576–578.
39. Quate F.E., Sutherland J.C., Sutherland B.M. Isolation of high molecular weight plant DNA for DNA damage quantitation: relative effects of solar 297 nm UVB 365

- nm radiation // *Plant Mol. Biol.* — 1994. — **24**. — P. 475—483.
40. *Britt A.B.* DNA damage and repair in plants // *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* — 1996. — **47**. — P. 75—100.
 41. *Mitchell D.L., Vaughau J.E., Narin R.S.* Inhibition of transient gene expression in Chinese hamster ovary cells by cyclobutane dimers and (6—4) photoproducts in transfected ultraviolet-irradiated plasmid DNA // *Plasmid*. — 1989. — **21**. — P. 21—30.
 42. *Protic-Sabljic M., Kraemer K.H.* One pyrimidine dimer inactivates expression of a transfected gene in xeroderma pigmentosum cells // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. — 1985. — **82**. — P. 6622—6626.
 43. *Donahue B.A., Taylor J.S., Reines D.* Transcript cleavage by RNA polymerase II arrested by a cyclobutane dimer in the DNA template // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. — 1994. — **91**. — P. 8502—8506.
 44. *Yoon J.-H., Lee C.-S., O'Connor T.R., Yasui A., Pfeifer G.P.* The DNA damage spectrum produced by simulated sunlight // *J. Mol. Biol.* — 2000. — **299**. — P. 681—693.
 45. *You Y.-H., Lee D.-G., Yoon J.-H., Yasui A., Pfeifer G.P.* Cyclobutane pyrimidine dimers are responsible for the vast majority of mutations induced by UVB irradiations in mammalian cells // *J. Biol. Chem.* — 2001. — **276**. — P. 44688—44694.
 46. *Demple B., Harrison L.* Repair of oxidative damage to DNA: enzymology and biology // *Annu. Rev. Biochem.* — 1994. — **63**. — P. 915—948.
 47. *Wang D., Kreutzer D.A., Essigmann J.M.* Mutagenicity and repair of oxidative DNA damage: insights from studies using defined lesions // *Mutat. Res.* — 1998. — **400**. — P. 99—115.
 48. *Caldecott K.W.* Protein-protein interactions during mammalian DNA single-strand break repair // *Biochem. Soc. Trans.* — 2003. — **31**. — P. 247—251.
 49. *Lindahl T.* Instability and decay of the primary structure of DNA // *Nature*. — 1993. — **362**. — P. 709—715.
 50. *Sancar A., Sancar G.B.* DNA repair enzymes // *Ann. Rev. Biochem.* — 1998. — **57**. — P. 29—67.
 51. *Friedberg E.C., Walker G.C., Siede W.* In DNA repair and mutagenesis. — Washington: Amer. Soc. Microbiol. Press, 1995.
 52. *Lindahl T., Wood R.D.* Quality control by DNA repair // *Science*. — 1999. — **286**. — P. 1897—1905.
 53. *Schärer O.D.* Chemistry and biology of DNA repair // *Angew. Chem. Int. Ed.* — 2003. — **42**. — P. 2946—2974.
 54. *Sancar A., Lindsay-Boltz L.A., Ünsal-Kaçmaz K., Linn S.* Molecular mechanisms of DNA repair and the DNA damage checkpoints // *Annu. Rev. Biochem.* — 2004. — **73**. — P. 39—85.
 55. *Britt A.B.* Molecular genetics of DNA repair in higher plants // *Trends Plant Sci.* — 1999. — **4**. — P. 20—25.
 56. *Hearst J.E.* The structure of photolyase: using photon energy for DNA repair // *Science*. — 1995. — **268**. — P. 1858—1859.
 57. *Sancar A.* Structure and function of DNA photolyase // *Biochemistry*. — 1994. — **33**. — P. 2—9.
 58. *Todo T., Ryo H., Yamamoto K., Toh H., Inui T. et al.* Similarity among the *Drosophila* (6—4)photolyase, a human photolyase homolog, and the DNA photolyase-blue light photoreceptor family // *Science*. — 1996. — **272**. — P. 109—112.
 59. *Chen J.-J., Mitchell D., Britt A.B.* A light-dependent pathway for the elimination of UV-induced pyrimidine (6—4) pyrimidinone photoproducts in *Arabidopsis thaliana* // *Plant Cell*. — 1994. — **6**. — P. 1311—1317.
 60. *Nakajima S., Sugiyama M., Iwai S., Hitomi K., Otsushi E., Kim S.-T., Jiang C.-Z., Todo T., Britt A.B., Yamamoto K.* Cloning and characterization of a gene (*UVR3*) required for photorepair of 6—4 products in *Arabidopsis thaliana* // *Nucl. Acids Res.* — 1998. — **26**. — P. 638—644.
 61. *Briggs W.R., Huala E.* Blue light photoreceptors in higher plants // *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* — 1999. — **15**. — P. 33—62.
 62. *Jiang C.-Z., Yee J., Mitchell D.L., Britt A.B.* Photorepair mutants of *Arabidopsis* // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. — 1997. — **94**. — P. 7441—7445.
 63. *Pang Q., Hays J.B.* UV-B inducible and temperature-sensitive photoreactivation of cyclobutane pyrimidine dimers in *Arabidopsis thaliana* // *Plant Physiol.* — 1991. — **95**. — P. 536—543.
 64. *Hada M., Hino K., Takeuchi Y.* Development of UV defense mechanisms during growth of Spinach seedlings // *Plant Cell Physiol.* — 2001. — **42**. — P. 784—787.
 65. *Hada M., Tsurumi S., Suzuki M., Wellmann M., Hashimoto T.* Involvement and non-involvement of pyrimidine dimer formation in UV-B effects on *Sorghum bicolor* Moench seedlings // *J. Plant Physiol.* — 1996. — **148**. — P. 92—99.
 66. *Hidema J., Kumagai T., Sutherland J.C., Sutherland B.M.* UV radiation-sensitive Norin 1 rice contains defective cyclobutane pyrimidine dimer photolyase // *Plant Cell*. — 2000. — **12**. — P. 1569—1578.
 67. *Quate F.E., Takayanagi S., Ruffini J., Sutherland J.C., Sutherland B.M.* DNA damage levels determine cyclobutyl pyrimidine dimer repair mechanisms in alfalfa seedlings // *Plant Cell*. — 1994. — **6**. — P. 1635—1641.
 68. *Takahashi S., Nakajima N., Saji H., Kondo N.* Diurnal change of cucumber CPD photolyase gene (*CsPHR*) expression and its physiological role in growth under UV-B irradiation // *Plant Cell Physiol.* — 2002. — **43**. — P. 342—349.

69. Sutherland B.M., Takayanagi S., Sullivan J.H., Sutherland J.C. Plant responses to changing environmental stress: cyclobutyl pyrimidine dimer repair in soybean leaves // Photochem. Photobiol. — 1996. — 64. — P. 464–468.
70. Taylor R.M. Ultraviolet-B-induced DNA lesions and their removal in wheat (*Triticum aestivum* L.) leaves // Plant Cell Environ. — 1996. — 19. — P. 171–181.
71. Waterworth W.M., Jiang Q., West C.E., Nikaido M., Bray C.M. Characterization of *Arabidopsis* photolyase enzymes and analysis of their role in protection from ultraviolet-B radiation // J. Exp. Bot. — 2002. — 53. — P. 1005–1015.
72. Kimura S., Tahira G., Ishibashi T., Mori G., Hashimoto J., Sakaguchi K. DNA repair in higher plants; photoreactivation is the major DNA repair pathway in non-proliferating cells while excision repair (nucleotide excision repair and base excision repair) is active in proliferating cells // Nucl. Acids Res. — 2004. — 32. — P. 2760–2767.
73. Dany A.-L., Douki T., Triantaphylides C., Cadet J. Repair of the main UV-induced thymine dimeric lesions within *Arabidopsis thaliana* DNA: evidence for the major involvement of photoreactivation pathways // J. Photochem. Photobiol. B: Biology. — 2001. — 16. — P. 127–135.
74. Britt A.B., Chen J.-J., Wykoff D., Mitchell D. A UV-sensitive mutant of *Arabidopsis* defective in the repair of pyrimidine-pyrimidine (6–4) dimers // Science. — 1993. — 261. — P.1571–1574.
75. Lo H.-L., Nakajima S., Ma L., Walter B., Yasui A., Thell D.W., Owen L.B. Differential effects of CPD and 6–4 PP UV-induced DNA damage on the induction of apoptosis and cell-cycle arrest // BMC Cancer. — 2005. — 5. — P. 135–144.
76. Britt A., Fiscus E.L. Growth responses of *Arabidopsis* DNA repair mutants to solar irradiation // Physiol. Plant. — 2003. — 118. — P. 183–192.
77. Ahmad M., Jarillo J.A., Klimchak L.J., Landry L.G., Peng T., Last R.L., Cashmore A.R. An enzyme similar to animal tyhe II photolyases mediates photoreactivation in *Arabidopsis* // Plant Cell. — 1997. — 9. — P. 199–207.
78. Yoshihara R., Imaki T., Yori M., Watanabe C., Yamamoto K., Takimoto K. CPD photolyase gene from *Spinacia oleracea*: repair of UV-damaged DNA and expression in plant organs // J. Radiat. Res. — 2005. — 46. — P. 157–164.
79. Hirouchi T., Nakajima S., Najrana T., Tanaka M., Matsunaga T., Hidema J., Teranishi M., Fujino T., Kumagai T., Yamamoto K. A gene for Class II DNA photolyase from *Oryza sativa*: cloning of the cDNA by dilution-amplification // Mol. Gen. Genom. — 2003. — 269. — P. 508–516.
80. Prakash S., Prakash L. Nucleotide excision repair in yeast // Mutat. Res. — 2000. — 451. — P. 13–14.
81. Wilson D.M., Thompson L.H. Life without DNA repair // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. — 1997. — 94. — P. 12754–12757.
82. Bowman K.K., Sidik K., Smith C.A., Taylor J.-S., Doetsch P.W., Freyer G.A. A new ATP-dependent DNA endonuclease from *S.pombe* that recognizes cyclobutane pyrimidine dimers and 6–4 photoproducts // Nucl. Acids Res. — 1994. — 22. — P.3026–3032.
83. Doetsch P.W., McCray W.H., Valenzuela M.R.L. Partial purification and characterization of an endonuclease from spinach that cleaves ultraviolet light-damaged duplex DNA // Biochim. Biophys. Acta. — 1989. — 1007. — P. 309–317.
84. Murphy T.M., Martin C.P., Kami J. Endonuclease activity from tobacco nuclei specific for ultraviolet radiation-damaged DNA // Physiol. Plant. — 1993. — 87. — P. 417–425.
85. Costa R.M.A., Lima W.C., Vogel C.I.G., Berra C.M., Luche D.D., Medina-Silva R., Galhardo R.S., Menck C.F.M., Oliveira V.R. DNA repair-related genes in sugarcane expressed sequence tags (ESTs) // Genet. Mol. Biol. — 2001. — 24. — P. 141–146.
86. Ohtsubo T., Matsuda O., Iba K., Terashima I., Sekiguchi M., Nakabeppu Y. Molecular cloning of *AtMMH*, an *Arabidopsis thaliana* ortholog of the *Escherichia coli mutM* gene, and analysis of functional domains of its product // Mol. Gen. Genet. — 1998. — 259. — P. 577–590.
87. Gao M.-J., Murphy T.M. Alternative forms of formamidopyrimidine-DNA glycosylase from *Arabidopsis thaliana* // Photochem. Photobiol. — 2001. — 73. — P. 128–134.
88. Dani A.L., Tissier A. A functional *OGG1* homologue from *Arabidopsis thaliana* // Mol. Genet. Genom. — 2001. — 265. — P. 293–301.
89. Shi L., Kent R., Bence N., Britt A.B. Developmental expression of a DNA repair gene in *Arabidopsis* // Mutat. Res. — 1997. — 384. — P. 145–156.
90. Santerre A., Britt A. Cloning of 3'-methyladenine-DNA glycosylase from *Arabidopsis thaliana* // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. — 1994. — 91. — P. 2240–2244.
91. Roldan-Arjona T., Garcia-Ortiz M.-V., Ruiz-Rubio M., Ariza R.R. cDNA cloning, expression and functional characterization of an *Arabidopsis thaliana* homologue of the *Escherichia coli* repair enzyme endonuclease III // Plant Mol. Biol. — 2000. — 44. — P. 43–52.
92. Uchiyama Y., Kimura S., Yamamoto T., Ishibashi T., Sakaguchi K. Plant DNA Polymerase λ , a DNA repair enzyme that functions in plant meristematic and meiotic tissue // Eur. J. Biochem. — 2004. — 271. — P. 2799–2807.
93. McLennan A.G. The repair of ultraviolet light-induced DNA damage in plant cells // Mutat. Res. — 1987. — 181. — P. 1–7.
94. Wood R.D., Mitchell M., Sgouros J., Lindahl J. Human DNA repair genes // Science. — 2001. — 291. — P. 284–289.

95. Jiang C.-Z., Yen C.-N., Kronin K., Mitchell D., Britt A.B. UV-B and gamma-radiation sensitive mutants of *Arabidopsis thaliana* // Genetics. — 1997. — **147**. — P. 1401–1409.
96. Jenkins M.E., Harlow G.R., Liu Z., Shorwell M.A., Va J., Mount D.W. Radiation-sensitive mutants of *Arabidopsis thaliana* // Genetics. — 1995. — **140**. — P. 725–723.
97. Kunz B.A., Anderson J.H., Osmond M.J., Vonarx E.J. Components of nucleotide excision repair and DNA damage tolerance in *Arabidopsis thaliana* // Envir. Mol. Mut. — 2005. — **45**. — P. 115–127.
98. Liu Z., Hossain G.S., Islas-Osuna M.A., Mitchell D.L., Mount D.W. Repair of UV damage in plants by nucleotide excision repair: *Arabidopsis UVH1* DNA repair gene is a homolog of *Saccharomyces cerevisiae RAD1* // Plant J. — 2000. — **21**. — P. 519–528.
99. Fidansef A., Mitchell D., Britt A. The *Arabidopsis UVH1* gene is a homolog of the yeast repair endonuclease *RAD1* // Plant Physiol. — 2000. — **124**. — P. 579–586.
100. Gallego F., Fleck O., Li A., Wrykowska J., Tinland B. AtRAD1, a plant homolog of human and yeast nucleotide excision repair endonucleases, is involved in dark repair of UV damages and recombination // Plant J. — 2000. — **21**. — P. 507–519.
101. Dubest S., Gallego M.E., White C.I. Role of the AtRad1p endonuclease in homologous recombination in plants // EMBO Rep. — 2002. — **3**. — P. 1049–1054.
102. Li A., Schuermann D., Gallego F., Kovalchuk I., Tinland B. Repair of damaged DNA by *Arabidopsis* cell extracts // Plant Cell. — 2002. — **14**. — P. 263–273.
103. Xu H., Swoboda I., Bhalla H.L., Sijbers A.M., Zhao C., Ong E.-K., Hoelijmakers J., Singh M.B. Plant homologue of human excision repair gene *ERCC1* points to conservation of DNA repair mechanisms // Plant J. — 1998. — **13**. — P. 823–829.
104. Dubest S., Gallego M.E., White C.I. Roles of the AtErcc1 protein in recombination // Plant J. — 2004. — **39**. — P. 334–342.
105. Hefner E., Preuss S.B., Britt A.B. A *Arabidopsis* mutants sensitive to gamma radiation include the homologue of the human repair gene *ERCC1* // J. Exp. Bot. — 2003. — **54**. — P. 669–680.
106. Sturm A., Lienhard S. Two isoforms of plant RAD23 complement a UV-sensitive *rad23* mutant in yeast // Plant J. — 1998. — **13**. — P. 815–821.
107. Liu Z., Hall J.D., Mount D.W. *Arabidopsis UVH3* gene is a homolog of the *Saccharomyces cerevisiae RAD2* and human *XPG* DNA repair genes // Plant J. — 2001. — **26**. — P. 329–338.
108. Ribeiro D.T., Machado C.R., Costa R.M.A., Praekelt U.M., Van Sluys M., Menck C.F.M. Cloning of cDNA from *Arabidopsis thaliana* homologous to the human *XPB* gene // Gene. — 1998. — **208**. — P. 207–213.
109. Costa R.M.A., Morgante P.G., Berra C.M., Nakabashi M., Bruneau D., Bouches D., Sweder K.S., Van Sluys M., Menck F.M. The participation of *AtXPB1*, the *XPB/RAD25* homologue gene from *Arabidopsis thaliana*, in DNA repair and plant development // Plant J. — 2001. — **28**. — P. 385–395.
110. Liu Z., Hong S.-W., Escobar M., Vierling E., Mitchell D.L., Mount D.W., Hall J.D. *Arabidopsis UVH6*, a homolog of human *XPD* and yeast *RAD3* DNA repair genes, functions in DNA repair and is essential for plant growth // Plant Physiol. — 2003. — **132**. — P. 1405–1414.
111. Svejstrup J.Q. Mechanisms of transcription-coupled DNA repair // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. — 2004. — **3**. — P. 21–29.
112. Ljungman M., Lane D.P. Transcription — guarding the genome by sensing DNA damage // Nature Rev. — 2004. — **4**. — P. 727–737.
113. Fridberg E.C., Gerlach V.L. Novel DNA polymerases offer clues to the molecular bases of mutagenesis // Cell. — 1999. — **98**. — P. 413–416.
114. Johnson R.E., Washington M.T., Prakash S., Prakash L. Bridging the gap: a family of novel DNA polymerases that replicate faulty DNA // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. — 1999. — **96**. — P. 12224–12276.
115. Prakash S., Johnson R.E., Prakash L. Eucaryotic translesion synthesis DNA polymerases: specificity of structure and function // Annu. Rev. Biochem. — 2005. — **74**. — P. 317–353.
116. Tang M., Shen X., Frank E.G., O'Donnell M., Woodgate R., Goodman M. UmuD'2C is an error-prone DNA polymerase, *E.coli* pol V // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. — 1999. — **96**. — P. 8919–8924.
117. Schlacher K., Leslie K., Wyman C., Woodgate R., Cox M.M., Goodman M.F. DNA polymerase V and RecA protein, a minimal mutasome // Mol. Cell. — 2005. — **17**. — P. 561–572.
118. Nelson G.R., Lawrence C.W., Hinkle D.C. Deoxycytidyl transferase activity of yeast REV1 protein // Nature. — 1996. — **382**. — P. 729–731.
119. Lawrence C.W., Hinkle D.C. DNA polymerase zeta and the control of DNA damage-induced mutagenesis in eukaryotes // Cancer Surv. — 1996. — **28**. — P. 21–31.
120. Yu S.-L., Johnson R.E., Prakash S., Prakash L. Requirement of DNA polymerase η for error-free bypass of UV-induced CC and TC photoproducts // Mol. Cell Biol. — 2001. — **21**. — P. 185–188.
121. Johnson R.E., Prakash S., Prakash L. Efficient bypass of thymine-thymine dimer by yeast DNA polymerase, Pol η // Science. — 1996. — **283**. — P. 1001–1004.
122. Masutani C., Kusumoto R., Yamada A., Dohmae N., Yokoi M., Yuasa M., Araki M., Iwai S., Takio K., Hanaoko F. The XPV (xeroderma pigmentosum variant) gene encodes human DNA polymerase η // Nature. — 1999. — **399**. — P. 700–704.
123. Johnson R.E., Washington M.T., Haracska L., Prakash S., Prakash L. Eukaryotic polymerases iota and zeta

- act sequentially to bypass DNA lesions // *Nature*. — 2000. — **406**. — P. 1015–1019.
124. Murakumo Y. The property of DNA polymerase ζ : REV7 is a putative protein involved in translesion synthesis and cell cycle control // *Mutat. Res.* — 2002. — **510**. — P. 37–44.
 125. Kozmin S.G., Pavlov Y.I., Kunkel T., Sage E. Roles of *Saccharomyces cerevisiae* DNA polymerases Pol η and Pol ζ in response to irradiation by simulated sunlight // *Nucl. Acids Res.* — 2003. — **31**. — P. 4541–4552.
 126. Okada T., Sonoda E., Yamashita M., Koyoshi S., Tateishi S., Yamaizumi M., Takata M., Ogawa O., Takeda S. Involvement of vertebrate Pol κ in Rad18-independent postreplication repair of UV damage // *J. Biol. Chem.* — 2002. — **277**. — P. 18690–18695.
 127. McCulloch S.D., Kokoska R.G., Chilkova O., Welch C.M., Johansson E., Burgers P.M.J., Kunkel T.A. Enzymatic switching for efficient and accurate translesion DNA replication // *Nucl. Acids Res.* — 2004. — **32**. — P. 4665–4675.
 128. Sakamoto A., Lan V.T.T., Hase Y., Shikazono N., Matsunaga T., Tanaka A. Disruption of the *AtREV3* gene causes hypersensitivity to ultraviolet B light and γ -rays in Arabidopsis: implication of the presence of a translesion synthesis mechanism in plants // *Plant Cell*. — 2003. — **15**. — P. 2042–2057.
 129. Takahashi S., Sakamoto A., Sato S., Kato T., Tabata S., Tanaka A. Roles of Arabidopsis *AtREV1* and *AtREV7* in translesion synthesis // *Plant Physiol.* — 2005. — **138**. — P. 870–881.
 130. Garcia-Ortiz M.V., Ariza R.R., Hoffman P.D., Hays J.B., Roldan-Arjona T. Arabidopsis thaliana *AtPOL κ* encodes a DinB-like DNA polymerase that extends mispaired primer termini and is highly expressed in a variety of tissues // *Plant J.* — 2004. — **39**. — P. 84–97.
 131. Schuermann D., Molinier J., Fritsch O., Hohn B. The dual nature of homologous recombination in plants // *Trends Genet.* — 2005. — **21**. — P. 172–181.
 132. Gorbunova V., Levy A.A. Non-homologous DNA end joining in plant cells is associated with deletions and filler DNA insertions // *Nucl. Acids Res.* — 1997. — **25**. — P. 4650–4657.
 133. Paques F., Haber J.E. Multiple pathways of recombination induced by double-strand break in *Saccharomyces cerevisiae* // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* — 1999. — **63**. — P. 349–404.
 134. Puchta H. The repair of double-strand breaks in plants: mechanisms and consequences for genome evolution // *J. Exp. Bot.* — 2005. — **56**. — P. 1–14.
 135. Symington L.S. Role of *RAD52* epistasis group genes in homologous recombination and double-strand break repair // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* — 2002. — **66**. — P. 630–670.
 136. Krogh B.O., Symington L.S. Recombination protein in yeast // *Annu. Rev. Genet.* — 2004. — **38**. — P. 233–271.
 137. McIlwraith M.J., Van Dyck E., Masson J.Y., Stasiak A.Z., West S.C. Reconstitution of the strand invasion step of double-strand break repair using human Rad51 Rad52 and RPA proteins // *J. Mol. Biol.* — 2000. — **304**. — P. 151–164.
 138. Bleuyard J.-Y., Gallego M.E., Savigny F., White C.I. Differing requirements for the Arabidopsis Rad51 paralogs in meiosis and DNA repair // *Plant J.* — 2005. — **41**. — P. 533–545.
 139. Osakabe K., Ichikawa H., Toki S. Molecular cloning and characterisation of *RAD51*-like genes from *Arabidopsis thaliana* // *Plant Mol. Biol.* — 2002. — **50**. — P. 71–81.
 140. Doutriaux M.P., Couteau F., Bergounioux C., White C. Isolation and characterisation of the *RAD51* and *DMC1* homologs from *Arabidopsis thaliana* // *Mol. Gen. Genet.* — 1998. — **257**. — P. 283–291.
 141. Li W., Chen C., Markmann-Mulish U., Timofejeva L., Schmelzer E., Ma H. The Arabidopsis *AtRAD51* gene is dispensable for vegetative development but required for meiosis // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. — 2004. — **101**. — P. 10596–10601.
 142. Gallego M.E., Jeanneau M., Granier F., Bouchez D., Bechtold N., White C.I. Disruption of the Arabidopsis *RAD50* gene leads to the plant sterility and MMS sensitivity // *Plant J.* — 2001. — **25**. — P. 31–41.
 143. Gallego M.E., White C.I. *RAD50* function is essential for telomere maintenance in *Arabidopsis* // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. — 2001. — **98**. — P. 1711–1716.
 144. Daoudal-Cotterell S., Gallego M.E., White C.I. The plant Rad50-Mre11 protein complex // *FEBS Lett.* — 2002. — **516**. — P. 164–166.
 145. Bleuyard J.Y., Gallego M.E., White C.I. Meiotic defects in the *Arabidopsis rad50* mutant point to conservation of the MRX complex functions in early stages of meiotic recombination // *Chromosoma*. — 2004. — **113**. — P. 197–203.
 146. Gisler B., Salomon S., Puchta H. The role of double strand break-induced allelic homologous recombination in somatic plant cells // *Plant Cell*. — 2002. — **32**. — P. 277–284.
 147. Molinier J., Ries G., Bonhoeffer S., Hohn B. Interchromatid and interhomolog recombination in *Arabidopsis thaliana* // *Plant Cell*. — 2004. — **16**. — P. 342–352.
 148. Siebert R., Puchta H. Efficient repair of genomic double-strand breaks by homologous recombination between directly repeated sequences in the plant genome // *Plant Cell*. — 2002. — **14**. — P. 1121–1131.
 149. Orel N., Kyryk A., Puchta H. Different pathways of homologous recombination are used for the repair of double-strand breaks within tandemly arranged sequences in the plant genome // *Plant J.* — 2003. — **35**. — P. 604–612.
 150. Puchta H., Dujon B., Hohn B. Two different but related mechanisms are used in plants for the repair of ge-

150. nomic double-strand breaks by homologous recombination // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* — 1996. — **93.** — P. 5055—5060.
151. *Simon G.R., Moore P.D.* Induction of homologous recombination in *Saccharomyces cerevisiae* // *Mol. Gen. Genet.* — 1988. — **214.** — P. 37—41.
152. *Tsujimura T., Maher V.M., Gudwin A.R., Liskay R.M., McCormick J.J.* Frequency of intrachromosomal recombination induced by UV radiation in normally repairing and excision repair-deficient human cells // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* — 1990. — **87.** — P. 1566—1570.
153. *Jin G., Ikushima T.* Frequent occurrence of UVB-induced sister chromatid exchanges in telomere regions and its implication to telomere maintenance // *Cytogen. Genome Res.* — 2004. — **104.** — P. 310—314.
154. *Puchta H., Svoboda P., Hohn B.* Induction of intrachromosomal homologous recombination in whole plants // *Plant J.* — 1995. — **7.** — P. 203—210.
155. *Ries G., Buchholz H., Hohn B.* UV-damage-mediated induction of homologous recombination in *Arabidopsis* is dependent on photosynthetically active radiation // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* — 2000. — **97.** — P. 13495—13429.
156. *Doucet-Chabeaud G., Godon C., Brutesco C., de Murcia G., Kazmaier M.* Ionising radiation induces the expression of *PARP-1* and *PARP-2* genes in *Arabidopsis* // *Mol. Genet. Genom.* — 2001. — **265.** — P. 954—963.
157. *Lucht J.M., Mauch-Mani B., Steiner H.-Y., Mettraux J.-P., Ryals J., Hohn B.* Pathogen stress increases somatic recombination frequency in *Arabidopsis* // *Nature Genet.* — 2002. — **30.** — P. 311—314.

Поступила 17.04.06