

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова
Национального исследовательского центра «Курчатовский институт»
(НИЦ «Курчатовский институт» - ПИЯФ)

На правах рукописи

Алексеева Елена Анатольевна

РОЛЬ ГЕНА *HIMI* В РЕГУЛЯЦИИ МУТАЦИОННОГО ПРОЦЕССА У
ДРОЖЖЕЙ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Специальность:

1.5.7 Генетика

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Научный руководитель:

доктор биологических наук

В.Г. Королев

Гатчина

2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	10
1.1. Характеристика объекта исследования.....	10
1.1.1. Гены эпистатической группы <i>HSM3</i>	10
1.1.2. Ген <i>HIM1</i> дрожжей <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	12
1.2. Обзор систем репарации у дрожжей <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	15
1.2.1. Чекпойнт.....	15
1.2.2. Прямая репарация.....	18
1.2.3. Эксцизионная репарация нуклеотидов.....	20
1.2.4. Эксцизионная репарация оснований.....	22
1.2.5. Мистматч репарация.....	24
1.2.6. Рекомбинационная репарация.....	27
1.2.7. Пострепликативная репарация или толерантность к повреждениям ДНК.....	33
1.2.7.1. Инициация пути ПРР.....	35
1.2.7.2. TLS путь.....	36
1.2.7.3. Безошибочный обход повреждений ДНК.....	37
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	41
2.1. Материалы.....	41
2.1.1. Штаммы дрожжей <i>Saccharomyces cerevisiae</i> использованные в работе....	41
2.1.2. Составы питательных сред.....	43
2.2. Методы.....	45
2.2.1. Получение мутантных штаммов.....	45
2.2.2. Чувствительность к УФ-свету.....	46

2.2.3. УФ-индуцированный мутагенез.....	47
2.2.4. Выделение хромосомной ДНК из клеток дрожжей.....	48
2.2.5. ПЦР.....	48
2.2.6. Спектры мутаций устойчивости к канаванину.....	49
2.2.7. Учет возникновения спонтанных мутаций устойчивости к канаванину...	49
2.2.8. Выделение тотальной РНК из клеток дрожжей.....	51
2.2.9. Получение кДНК.....	52
2.2.10. ПЦР в реальном времени.....	52
2.2.11. Трансформация дрожжевых клеток.....	53
2.2.12. Статистические методы обработки результатов.....	54
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ.....	55
3.1. Отношение гена <i>HIM1</i> к контролю безошибочной ветви пострепликативной репарации.....	56
3.1.1. Взаимодействие мутации <i>mms2Δ</i> с мутацией <i>him1Δ</i>	56
3.1.2. Взаимодействие мутации <i>xrs2Δ</i> с мутацией <i>him1Δ</i>	57
3.2. Участие продукта гена <i>HIM1</i> в стабилизации D-петли.....	58
3.2.1. Взаимодействие мутации <i>tph1Δ</i> с мутацией <i>him1Δ</i>	59
3.2.2. Взаимодействие мутации <i>srs2Δ</i> с мутацией <i>him1Δ</i>	60
3.2.3. Взаимодействие мутации <i>mms4Δ</i> с мутацией <i>him1Δ</i>	62
3.3. Взаимодействие генов <i>HIM1</i> и <i>RAD30</i>	63
3.3.1. Взаимодействие мутации <i>rad30Δ</i> с мутацией <i>him1Δ</i>	63
3.3.2. Изучение спектра мутаций в локусе устойчивости к канаванину у мутантов <i>him1Δ</i> и <i>him1Δ rad30Δ</i>	65
3.4. Взаимодействие гена <i>HIM1</i> с генами, контролирующими различные этапы чекпойнта.....	69

3.4.1. Взаимодействие мутации <i>him1Δ</i> с мутацией в гене <i>RAD53</i> , затрагивающей С-концевой домен киназы Rad53.....	69
3.4.2. Взаимодействие мутации <i>him1Δ</i> с мутациями <i>pph3Δ</i> и <i>psy4Δ</i>	71
3.5. Влияние уровня дНТФ на <i>him1</i> -зависимый УФ-индуцированный мутагенез.....	73
3.5.1. Взаимодействие мутации <i>sml1Δ</i> с мутацией <i>him1Δ</i>	73
3.5.2. Взаимодействие мутации <i>dun1Δ</i> с мутацией <i>him1Δ</i>	74
3.5.3. Изучение экспрессии гена <i>RNR3</i> в штамме с делецией гена <i>HIM1</i>	75
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ.....	78
4.1. Роль гена <i>HIM1</i> в регуляции мутационного процесса.....	78
ВЫВОДЫ.....	85
СПИСОК ПРИНЯТЫХ СОКРАЩЕНИЙ.....	86
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	88
ПРИЛОЖЕНИЕ 1.....	101
БЛАГОДАРНОСТИ.....	111

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы. Одним из важнейших процессов, происходящих в клетке, является процесс репарации ДНК, обеспечивающий целостность генома. Системы репарации важны для восстановления нативной структуры ДНК после возникновения в ней повреждений. Повреждения ДНК вызываются различными ДНК-повреждающими агентами, которые могут быть как эндогенными (продукты клеточного метаболизма), так и экзогенными (УФ-, γ -излучение; азотистая кислота, метилметансульфонат (ММС), гидроксимочевина (ГМ) и др.). Нарушение работы систем репарации, в частности, связано с рядом наследственных заболеваний человека. Системы репарации тесно связаны с возникновением спонтанных и индуцированных мутаций у всех организмов. Известно, что системы репарации у дрожжей и высших млекопитающих, подобны. Дрожжи-сахаромицеты благодаря удобству и простоте работы с ними, являются важным модельным объектом для изучения процессов репарации ДНК и генов, контролирующих различные этапы этих процессов у эукариотических организмов. Основной задачей данной работы было изучить функции гена *HIM1* в процессах репарации и мутагенеза у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Данный ген был выделен в Лаборатории генетики эукариот НИЦ «Курчатовский институт»-ПНДЯФ, в составе коллекции мутантов по генам эпистатической группы *HSM3*, отличавшихся повышенной частотой как индуцированного, так и спонтанного мутагенеза. Ген *HIM1* уникален тем, что у него нет гомологов ни среди генов бактерий, ни растений, ни млекопитающих. Гомологи данного гена встречаются лишь у нескольких видов дрожжей (*Torulaspora delbrueckii*, *Zugosaccharomyces rouxii*, *Vanderwaltozyma polyspora*, *Candida glabrata*). Поскольку мутации по данному гену вызывают повышенную частоту как спонтанных, так и индуцированных мутаций, то это говорит о его участии в регуляции мутационного процесса.

Цель исследования. Изучить роль гена *HIM1* в регуляции мутационного процесса у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*.

Задачи исследования:

- 1) Исследовать отношение гена *HIM1* к контролю безошибочной ветви пострепликативной репарации;
- 2) Исследовать влияние мутации *him1Δ* на стабильность D-петли;
- 3) Исследовать влияние уровня дНТФ на *him1*-зависимый УФ-индуцированный мутагенез;
- 4) Исследовать влияние мутации *rad30Δ* на *him1*-зависимый УФ-индуцированный мутагенез.

Научная новизна работы. Ген *HIM1* был открыт в лаборатории генетики эукариот Отделения молекулярной и радиационной биофизики Петербургского института ядерной физики им. Б.П. Константинова более 30 лет назад. За это время по нему было опубликовано небольшое количество статей, написанных сотрудниками данной лаборатории. Нами впервые были получены двойные мутанты, несущие как мутацию *him1Δ*, так и мутации нарушающие первые этапы безошибочной ветви пострепликативной репарации (*mms2Δ*, *xrs2Δ*), нарушающие деградацию D-петель (*mph1Δ*, *srs2Δ*, *mms4Δ*), нарушающие скорость синтеза ДНК (*sml1Δ*, *dun1Δ*, *pph3Δ*, *psy4Δ*, *rad53+HA-F*) и мутацию инактивирующую активность ДНК-полимеразы η (*rad30Δ*). Впервые было показано влияние мутации *him1Δ* на экспрессию гена *RNR3*. Впервые была предложена схема участия полимеразы η в возникновении мутаторного фенотипа мутанта *him1Δ*.

Теоретическая и практическая значимость исследования. Полученные результаты имеют теоретическую значимость, состоящую в понимании механизмов толерантности к повреждению ДНК, и могут быть использованы при чтении лекций по курсам Мутационный процесс и Радиобиология.

Основные положения, выносимые на защиту.

- 1) Ген *HIM1* участвует в контроле безошибочной ветви пострепликативной репарации у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*;

- 2) Делеция гена *HIMI* приводит к дестабилизации D-петли;
- 3) Мутация *him1Δ* влияет на экспрессию гена *RNR3*, входящего в состав рибонуклеотид редуктазного комплекса RNR;
- 4) Мутация *him1Δ* влияет на смену репликативной ДНК полимеразы δ на TLS ДНК-полимеразу η .

Личный вклад автора. Все исследования в ходе данной работы проводились лично автором, за исключением: получения некоторых штаммов дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* (представлены в таблице 1 в Главе «Материалы и методы») — н.с. ЛГЭ ПИЯФ ОМРБ Т.А. Евстюхина и м.н.с. ЛГЭ ПИЯФ ОМРБ Д.В. Федоров. Получение ПЦР кассет — с.н.с. ЛГЭ ПИЯФ ОМРБ В.Т. Пешехонов.

Апробация работы. Работа была представлена на: XVIII Зимней молодежной школе по биофизике и молекулярной биологии, Гатчина, 11-16 марта 2017 г.; 21-й Международной Пущинской школе-конференции молодых ученых «Биология-наука XXI века», Пущино, 17-21 апреля 2017 г.; X Всероссийском конгрессе молодых ученых-биологов «Симбиоз–России 2017», Казань, 25-28 октября 2017 г.; IV ежегодном Молодежном научном форуме «OpenScience - 2017», Гатчина, 15-17 ноября 2017 г.; Зимней молодежной школе по биофизике и молекулярной биологии, Гатчина, 17-22 февраля 2018 г.; V ежегодном Молодежном научном форуме «OpenScience - 2018», Гатчина; Зимней молодежной школе по биофизике и молекулярной биологии-2019, Гатчина; Международном конгрессе «VII съезд Вавиловского общества генетиков и селекционеров, посвященный 100-летию кафедры генетики СПбГУ», 18-22 июня 2019, Санкт-Петербург; VI ежегодном Молодежном научном форуме «OpenScience-2019», Гатчина; XXI Зимней молодежной школе по биофизике и молекулярной биологии, 24-29 февраля 2020, Гатчина; IV Международной научной конференции "Генетика и биотехнология XXI века: проблемы, достижения, перспективы", 2-6 ноября 2020, Минск; V Международной конференции посвященной Н.В. Тимофееву-Ресовскому «Современные проблемы

генетики, радиобиологии, радиоэкологии и эволюции: GRRE2021» 5-9 октября 2021 г., Ереван, Армения; VIII Всероссийском с международным участием; Молодежном научном форуме «Open Science 2021», Россия, Гатчина, 17 – 19 ноября 2021.

Публикации. По материалам работы опубликовано 3 статьи:

1. Алексеева Е.А. Взаимодействие продукта гена *HIM1* с геликазами Srs2 (RadH) и Mph1 дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* / Алексеева Е.А., Евстюхина Т.А., Пешехонов В.Т., [и др] // Цитология, 2018. -Т. 60. -№ 7. -С. 555-557. doi: 10.31116/tsitol.2018.07.13

2. Алексеева Е.А., Королев В.Г. Толерантность к повреждению ДНК у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* / Алексеева Е.А., Королев В.Г. // Генетика, 2021. -Т.57. -№4. -С.371-383. doi: 10.31857/S0016675821040020

3. Alekseeva E.A. Participation of the *HIM1* gene of yeast *Saccharomyces cerevisiae* in the error-free branch of post-replicative repair and role Polη in *him1*-dependent mutagenesis / Alekseeva E.A., Evstyukhina T.A., Peshekhonov V.T., [et al] // Curr Genet., 2021. -V.67. -№1. -P.141-151. doi: 10.1007/s00294-020-01115-6

Объем и структура диссертации.

Диссертация изложена на 111 страницах и содержит 36 рисунков и 3 таблицы. Работа состоит из титульного листа, оглавления, введения, глав «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты», «Обсуждение», выводов, списка принятых сокращений, списка литературы, включающего 110 источников, раздела «Приложение1» и листа благодарностей.

Работа выполнена в Лаборатории генетики эукариот Отделения молекулярной и радиационной биофизики ФГБУ «Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова» Национального исследовательского центра «Курчатовский институт».

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 18-34-00540 - мол_а (2018-2020 гг), стипендии Благотворительного Фонда имени В.Н. Фомичева для аспирантов ОМРБ НИЦ «Курчатовский институт» - ПИЯФ и финансовой

поддержке “Курчатовского геномного центра – ПИЯФ” программой развития центров генетических исследований мирового уровня, Соглашение № 075-15-2019-1663.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Характеристика объекта исследования

1.1.1. Гены эпистатической группы *HSM3*

Мутанты по генам эпистатической группы *HSM3* были выделены у почкующихся дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* по следующим признакам: повышенной частоте индуцированного мутагенеза и низкой чувствительности к летальному действию повреждающих ДНК агентов [1, 2].

Выделенные мутанты были разделены на две группы, мутанты *hsm* (*High Spontaneous Mutagenesis*) и мутанты *him* (*High Induced Mutagenesis*).

Исследование мутантов *hsm*, выявило шесть неаллельных мутаций (*hsm1-hsm6*), которые приводят к повышению спонтанного и УФ-индуцированного мутагенеза, и практически не влияют на чувствительность клеток к УФ - и γ-лучам, а также метилметансульфонату.

Мутанты *him* были выделены по признаку повышенного уровня индуцированного мутагенеза под действием азотистой кислоты, также повышенный уровень мутагенеза у данного мутанта наблюдался и под действием других повреждающих ДНК агентов, таких как УФ-излучение и гидроксимочевина [3, 4].

Генетический анализ позволил разделить обе группы мутантов на несколько эпистатических групп генов, одной из которых является - *HSM3*, в нее попали мутанты по генам *HMO1 (HSM2)*, *HSM3*, *PSY4 (HSM6)* и *HIM1* [4].

Все мутанты по данным генам влияют на частоту индуцированной митотической рекомбинации, а также показано, что частота кроссинговера у этих мутантов значительно уменьшена, при том, что частота генной конверсии, наоборот, увеличена [5, 6, 7]. Таким образом, гены *HMO1 (HSM2)*, *HSM3*, *HSM6* и *HIM1* имеют отношение к контролю процесса рекомбинации. Приведенные выше

данные, показывают, что мутации в генах эпистатической группы *HSM3* негативно влияют на длину гибридной ДНК, которая возникает в течение репарации в D-петлях [8].

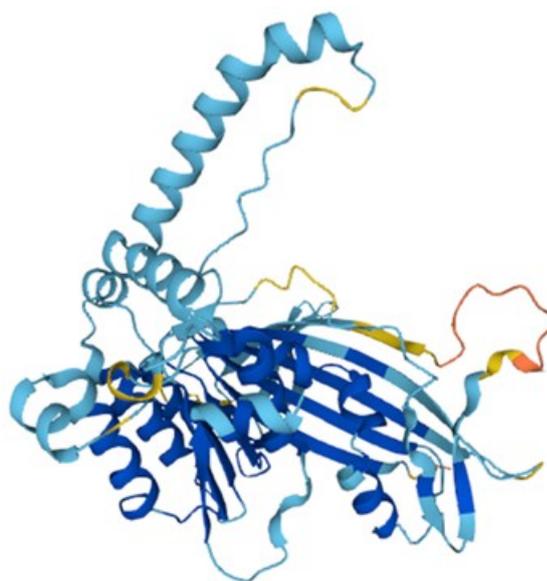
Известно, что продукт гена *HMO1*, относится к семейству HMG-белков, ассоциированных с хроматином и участвующих в поддержании стабильности генома [9]. Мутанты по этому гену оказывают наибольшее влияние на скорость спонтанного мутагенеза, среди мутантов по генам эпистатической группы *HSM3* [5].

Продукт гена *HSM3*, белок Hsm3 физически взаимодействует с субъединицами гистонацетилтрансферазного комплекса NuB4 (белками Hat1 и Hat2), принимающего участие в модификации и сборке хроматина [10, 11]. Также в ряде работ было показано, что он участвует в сборке протеасомного комплекса S26. [12] Исследования доменной структуры белка Hsm3 показали, что за взаимодействие с комплексом NuB4 отвечает С-терминальный домен белка, а за сборку протеасом центральный домен [13].

Ген *HSM6* был картирован на левом плече хромосомы II. Функциональный тест на аллелизм показал, что ген *HSM6* является аллелем гена *PSY4*. Продукт этого гена, белок Psy4 является третьей субъединицей фосфатазного комплекса PPH3 (Pph3, Pph2 и Psy4), который дефосфорилирует киназу Rad53, гистон γ H2A и участвует в контроле чекпойнта [14, 15].

1.1.2. Ген *HIM1* дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*

Одним из представителей эпистатической группы генов *HSM3*, является ген *HIM1* (*High Induced Mutagenesis*), он картирован на правом плече хромосомы IV и кодирует белок Him1, состоящий из 414 аминокислотных остатков (аминокислотная последовательность и структура белка Him1 представлены на Рисунке 1 [3], функции данного белка не изучены, некоторые известные функциональные взаимодействия белка Him1 с другими белками, приведены на Рисунке 2 (HIM1 protein (*Saccharomyces cerevisiae*) - STRING interaction network (string-db.org)).



```

1 MSYSVNTFTD YVLLFGSSSL VGKGILENLL DINLYIKNVS DLQGKLDLSL EIKGNVVLNK
61 HVFCVNRRCI NEEKSFMKTI DYINMRSVTW QGGRYLRSR KEKDTEKVPS SPNTFCYDNF
121 EEGFIKNTPE ERGKDGYSFV YNQKQFSYTL HYACGKEKGI EIICNFTVTQ LIIPRSETWP
181 KLLPRIFSGT QKLEKFDIDN KNYVPGRSLP SLCDISTMVC SLGSTSARVR RTQVPSSFAD
241 YYLPFNLAQE FTNTTNKRLV VTTAFNNDLF SKTFEYFRIK AKLENDLDEA LPNKLKELVI
301 LRPGPMCGQH GNPINVELGK ENSTFLEKIF YYPHYLLVYK KKYISEARRI GLRTKLSEII
361 ASSIYRMPGS ALLGYAVPVS KVSYVASLMA IERKSKEAGP KLEVISSYQI DMIV*

```

Рисунок 1. Аминокислотная последовательность и структура белка Him1 (HIM1 - Protein HIM1 - *Saccharomyces cerevisiae* (strain ATCC 204508 / S288c) (Baker's yeast) - HIM1 gene & protein (uniprot.org) 29.09.21. 16:14)

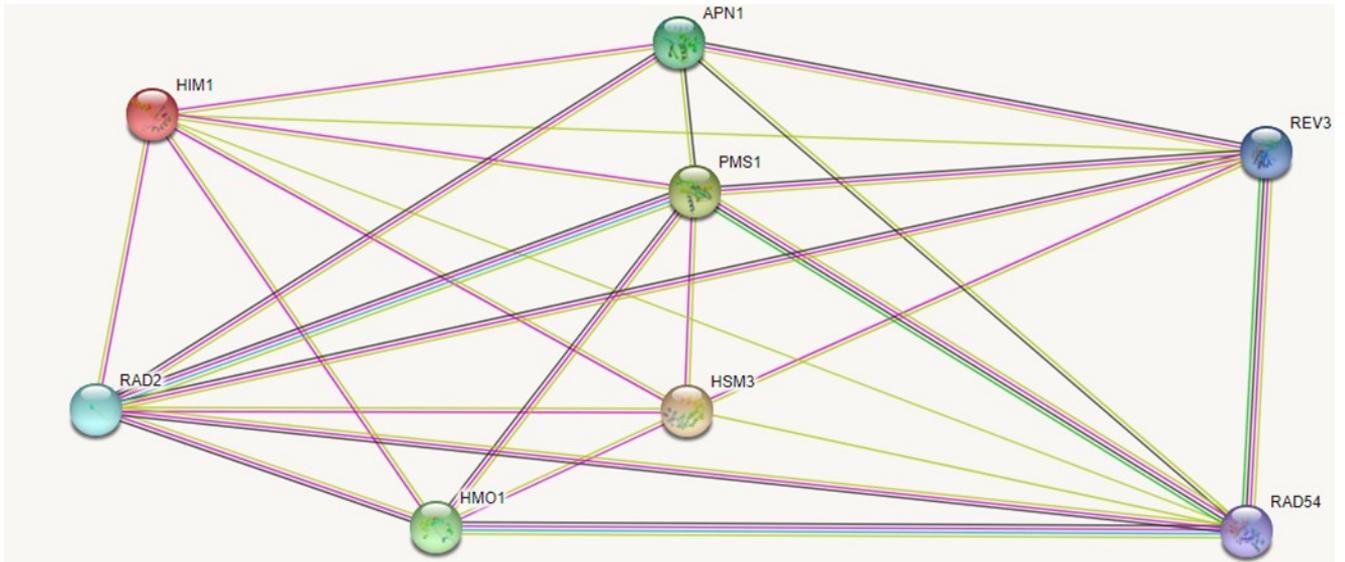


Рисунок 2. Известные функциональные взаимодействия белка Him1 (<https://string-db.org/cgi/network?taskId=bOVt20zJliwu&sessionId=b7CE473Q14D7> 29.09.21. 16:34)

Мутанты по гену *HIM1* были выделены по признаку повышенного уровня индуцированного мутагенеза под действием азотистой кислоты. Повышенный уровень мутагенеза у данного мутанта наблюдался также под действием других повреждающих ДНК агентов, таких как УФ-излучение и ГМ [3, 4]. К тому же мутант *him1* характеризуется повышенной частотой спонтанного мутагенеза [1].

У гена *HIM1* нет гомологов ни среди генов бактерий, ни растений, ни млекопитающих. Гомологи данного гена встречаются лишь у некоторых видов дрожжей (*Torulaspra delbrueckii*, *Zugosaccharomyces rouxii*, *Vanderwaltozyma polyspora*, *Candida glabrata*) (Рисунок 3).

Гомология	Покрытие запроса	Организм	Сходство (битрейт)	Ортология (уровень)
TDEL0E02790		Torulaspora delbrueckii	245.0	Saccharomycetaceae
XP_002497226.1		Zygosaccharomyces rouxii	239.2	Saccharomycetaceae
XP_001644214.1		Vanderwaltozyma polyspora	203.0	Saccharomycetaceae
XP_447108.1		Candida glabrata	192.6	Saccharomycetaceae
KAFR0C01880		Kazachstania africana	149.8	Saccharomycetaceae
KLTH0H14784p		Lachancea thermotolerans	149.8	Saccharomycetaceae
XP_003648288.1		Eremothecium cymbalariae	149.4	Saccharomycetaceae
AGR348Wp		Eremothecium gossypii	144.1	Saccharomycetaceae
TPHA0D02060		Tetrapisispora phaffii	141.0	Saccharomycetaceae
TBLA0A03100		Tetrapisispora blattae	117.5	Saccharomycetaceae
XP_451979.1		Kluyveromyces lactis	115.2	Saccharomycetaceae
K0KFG0		Wickerhamomyces ciferrii	55.5	-

Рисунок 3. Гомологи гена *HIM1* дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* (<https://string-db.org/cgi/proteinhomologyprotein=1859989&taskId=bU4ZjPbg8Csa&sessionId=btLABGP0xZER&referer=network>)

1.2. Обзор систем репарации у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*

1.2.1. Чекпойнт

В ответ на повреждение ДНК, клеткой активируется механизм, регулирующий остановку клеточного цикла, данный механизм носит название «чекпойнт». В клетках эукариот он координирует остановку клеточного цикла и репарацию ДНК [16], также чекпойнт связан с такими клеточными механизмами как, рекомбинационная репарация, ремодулирование структуры хроматина и пострепликативная репарация (ПРР).

Решающим сигналом для активации чекпойнта служит образование однонитевой ДНК (онДНК), которая является результатом репарации повреждений ДНК (Рисунок 4) [17].

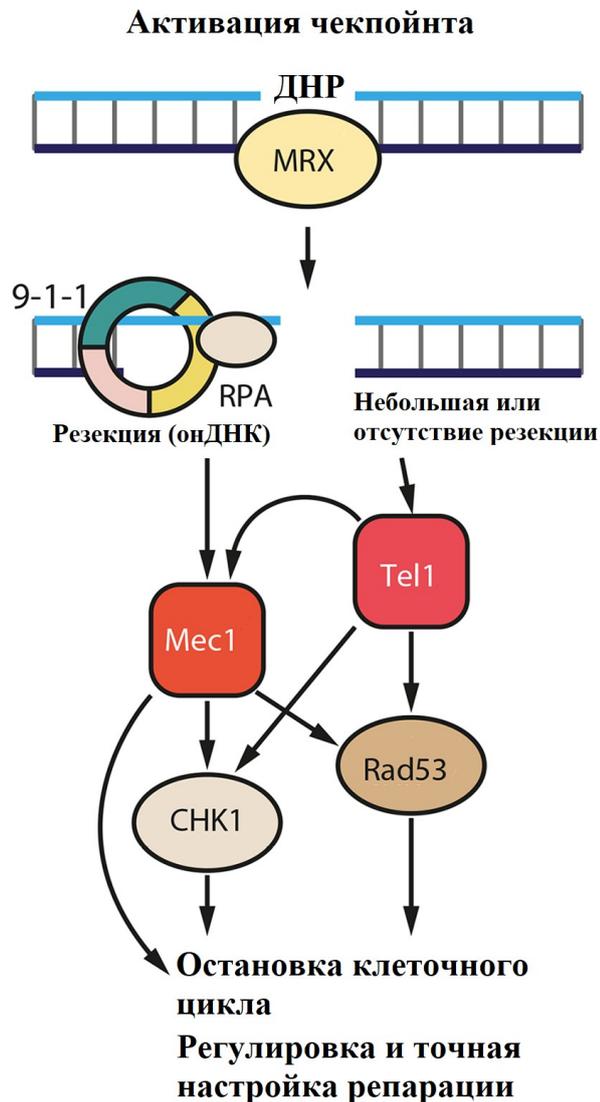


Рисунок 4. Активация чекпойнта [18]

При этом в зависимости от количества онДНК различают два типа чекпойнтного ответа - локальный или глобальный. Локальный чекпойнт, запускается небольшим количеством онДНК и приводит к фосфорилированию гистона γ H2A, но не запускает активацию киназы Rad53. При дальнейшем повышении количества онДНК происходит активация глобального чекпойнта, связанного с активацией киназы Rad53 [17].

Покрытая RPA онДНК привлекает чекпойнтную киназу Mec1, при помощи своего партнера Ddc2 (комплекс Mec1-Ddc2), она связывается с онДНК покрытой RPA [19]. После чего происходит освобождение и активация Mec1. Mec1

фосфорилирует субъединицу Ddc1 комплекса Rad17-Mec3-Ddc1 (9-1-1), эффекторную киназу Rad53 и адаптерный белок Rad9, который способствует дальнейшему автофосфорилированию Rad53 (Рисунок 5). Все приведенные выше белки являются важными компонентами чекпойнта [20].

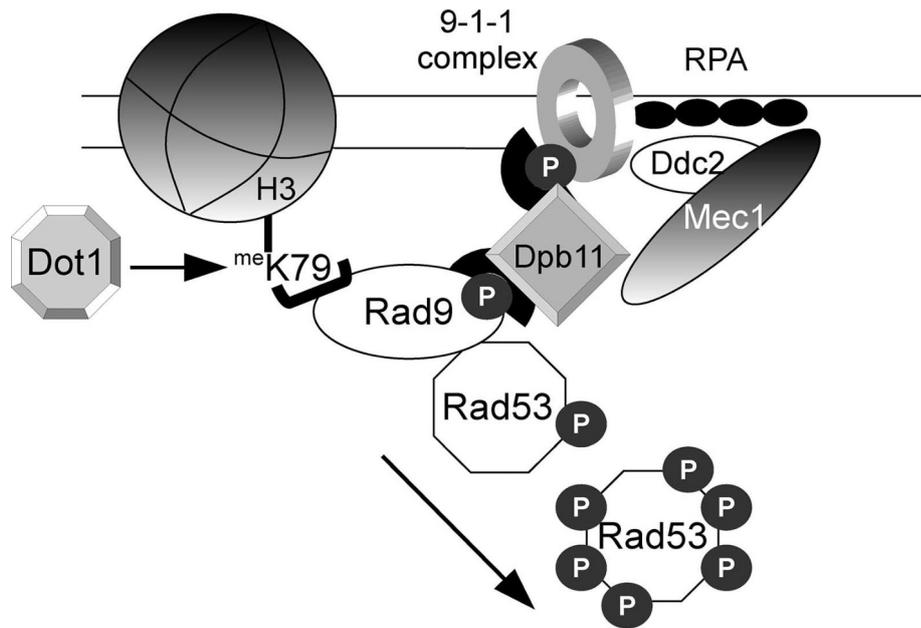


Рисунок 5. Механизм глобального чекпойнта [21]

Активация киназы Rad53, необходима для регуляции множества механизмов ответа на повреждения, включая подавление активации поздних ориджинов, контроль синтеза дезоксирибонуклеотидов, регуляцию транскрипции, вызванной повреждениями, задержку клеточного цикла [22], ремодулирование структуры хроматина и инициацию ПРР.

1.2.2. Прямая репарация

Эндогенные и экзогенные факторы постоянно воздействуют на ДНК клетки, образуя мутагенные и/или цитотоксические соединения ДНК. В результате эволюции клетки выработали различные механизмы защиты от таких повреждений ДНК [23]. Среди этих механизмов, можно выделить прямую репарацию ДНК - наиболее древнюю и простую из известных систем репарации, к ней относят такие процессы как: фотореактивация, ферментативное деалкилирование и окислительное дезаминирование азотистых оснований [23]. Все эти процессы проходят в одну стадию.

Под воздействием ультрафиолетового света (УФ) чаще всего образуется два основных класса стабильных аддуктов ДНК — это цикlobутановые димеры пиримидина (CPD) и 6-4 фотопродукты (6-4 PP). Оба аддукта приводят к блоку транскрипции и репликации, мутациям, гибели клеток и раку [24].

В качестве примера прямой репарации рассмотрим процесс фотореактивации. В нем задействованы специальные ферменты - фотолиазы, способные быстро устранять повреждения ДНК, вызванные воздействием УФ-света, восстанавливая исходную структуру нуклеотидов.

Впервые фотореактивация была открыта Келнером в 1949 году у бактерий [25], что послужило началом изучения репарационных систем. В том же году фотореактивация была открыта у бактериофагов и высших эукариот. Суть процесса фотореактивации сводится к следующему: жизнеспособность клеток бактерий после воздействия на них УФ-света, восстанавливается, если после облучения воздействовать на них видимым светом. Восстановительный эффект связан с действием фермента – фотолиазы, который расщепляет димеры двух соседних пиримидинов цикlobутанового типа в одной нити ДНК (Рисунок 6).

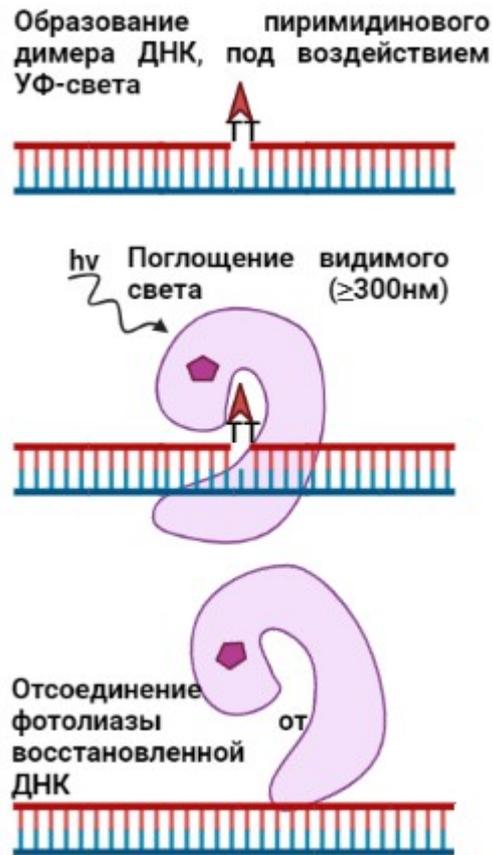


Рисунок 6. Механизм фотореактивации (Created with BioRender.com)

В ДНК дрожжей фотореактивация пиримидиновых димеров происходит с помощью продуктов генов *PHR1* (фотолиаза I) и *PHR2* (фотолиаза II) вспомогательный белок, возможно регулятор транскрипции *PHR1*) [26, 27, 28].

1.2.3. Эксцизионная репарация нуклеотидов

Эксцизионная репарация нуклеотидов (ЭРН), как и процесс фотореактивации, нацелена на повреждения, вызванные воздействием УФ-света на ДНК, она устраняет циклобутановые пиримидиновые димеры и 6-4 фотопродукты из молекулы ДНК [24].

ЭРН — сложный процесс, у эукариот требующий более 30 различных белков. Все эти белки действуют последовательно: распознавая и проверяя повреждения ДНК, разрезая ДНК с обеих сторон от повреждения, удаляя одноцепочечный олигонуклеотид (длинной 25-30 нуклеотидов), содержащий повреждение, застраивая образовавшуюся брешь ДНК-полимеразой и лигируя ДНК.

Процесс ЭРН в клетках эукариот также осложнен тем, что для его нормальной работы требуется ремодулирование структуры хроматина [24, 29, 30].

В ЭРН различают два подпути: ЭРН, связанная с транскрипцией (ТС-ЭРН) и глобальная геномная ЭРН (ГГ-ЭРН). Оба подпути различаются только на начальном этапе распознавания повреждения ДНК [30].

В ТС-ЭРН РНК-полимераза II функционирует как определитель повреждений ДНК, а ее остановка перед повреждением, служит сигналом для инициации репарации. ТС-ЭРН отвечает только за репарацию повреждений ДНК, расположенных в транскрибируемой области генов, подвергающихся транскрипции. В свою очередь, ГГ-ЭРН полагается на специфические белки распознавания повреждений (у дрожжей Rad4), по всему геному. Эти подпути сливаются после опознавания повреждения и используют один и тот же набор ферментов для последующих этапов (Рисунок 7) [30, 31, 32].

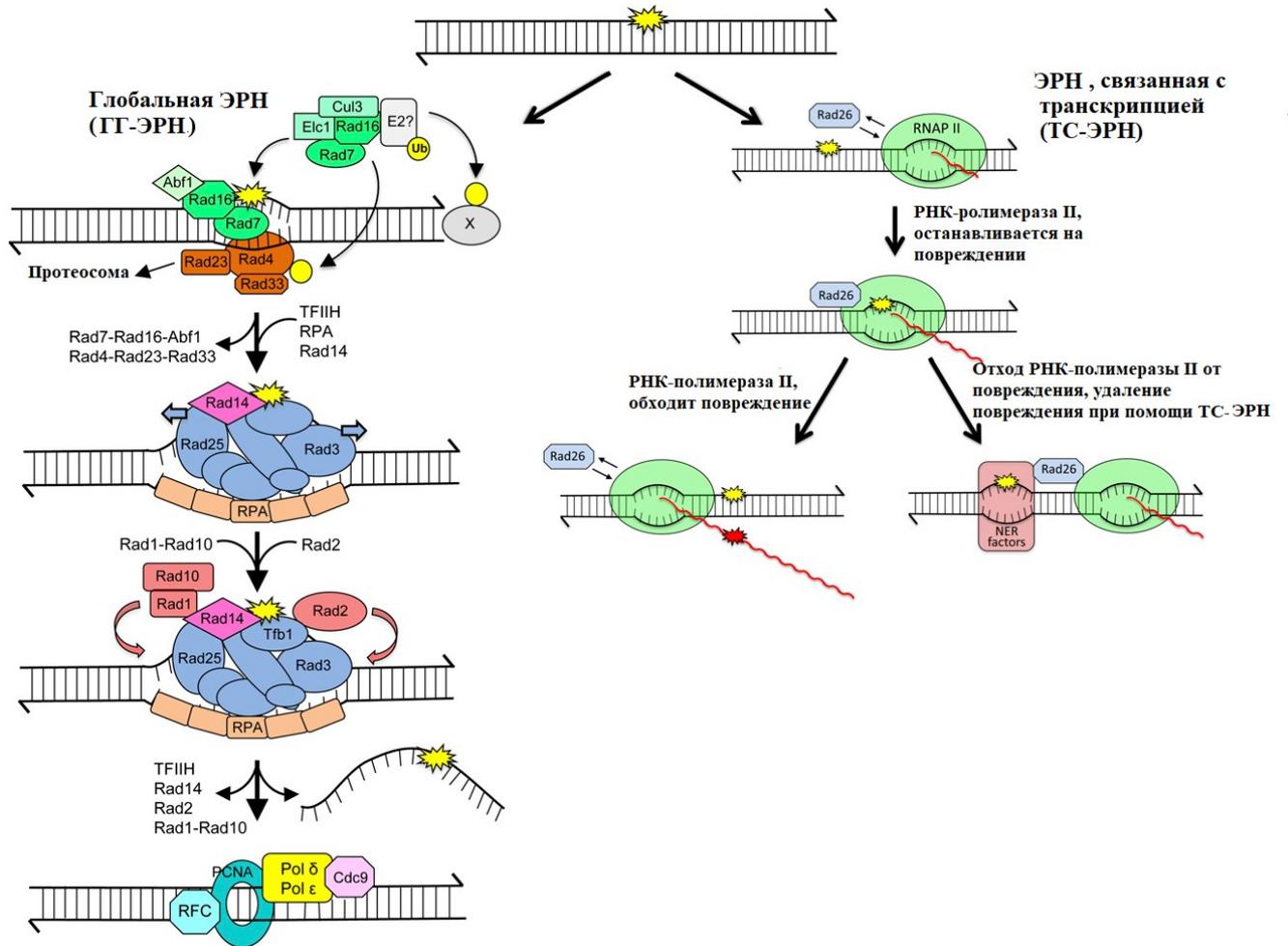


Рисунок 7. Механизм ГГ-ЭРН и ТС-ЭРН по [28]

У дрожжей белки, относящиеся к системе ЭРН, составляют эпистатическую группу Rad3. К ней относятся белки Rad1p, Rad2p, Rad3p, Rad4p, Rad10p, Rad14p, Rad25p и др. Белок Rad2p разрезает одну из цепей ДНК в непосредственной близости от повреждения с 3'-конца. Гетеродимер Rad10/Rad1 делает разрез той же нити ДНК в области 5'. Другие факторы ЭРН участвуют в дальнейших этапах репарации.

1.2.4. Эксцизионная репарация оснований

Эксцизионная репарация оснований (ЭРО) восстанавливает структуру ДНК после воздействия различных физических и химических факторов эндогенной и экзогенной природы, связанных с различными модификациями оснований или их выпадением [33].

Повреждения устраняются путем удаления поврежденных азотистых оснований при помощи специфических ферментов ДНК-гликозилаз. ДНК-гликозилазы, являются ключевыми ферментами, отщепляющими различные модифицированные основания ДНК, с образованием AP-сайта. AP-сайты являются потенциально мутагенными и летальными повреждениями ДНК, и должны быть удалены из ее структуры. Для этого вначале происходит инцизия (однонитевой разрез) по фосфодиэфирной связи AP-эндонуклеазами с 5'-конца. Затем гидролизуется связь с 3'-стороны от повреждения, в результате чего образуется однонуклеотидная брешь.

ЭРО происходит в четыре этапа:

- 1) Распознавание и удаление поврежденного основания;
- 2) Создание одно нуклеотидной бреши на месте повреждения;
- 3) Синтез ДНК;
- 4) Лигирование ДНК [33].

Рассмотрим более подробно представленные этапы ЭРО, при воздействии ММС на клетки дрожжей. При воздействии ММС преобладающими формами повреждений ДНК являются N-метилпурины (N7-метилгуанин и N3-метиладенин), которые блокируют репликацию. У дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* ЭРО таких повреждений инициируется ДНК-гликозилазой Mag1, которая распознает и удаляет метилированные основания, оставляя AP-сайты. AP-сайты затем удаляются эндонуклеазами Apr1 или Apr2, делая одноцепочечные разрывы ДНК с 5'PO₄-концов, либо AP-лиазами, такими как Ntg1 или Ntg2, с получением одноцепочечных разрывов ДНК с 3'ОН-концов. Концы 5'PO₄

вырезаются ДНК-эндонуклеазой Rad27, в то время как концы 3'ОН удаляются 3'-фосфодиэстеразной активностью Apn1 и Apn2. Образовавшаяся однонуклеотидная брешь расширяется экзонуклеазой при содействии ряда белков. Затем брешь заполняется полимеразой δ или ϵ , и репарация завершается лигированием ников, при помощи ДНК-лигазы Cdc9 (Рисунок 8) [34, 35, 3].

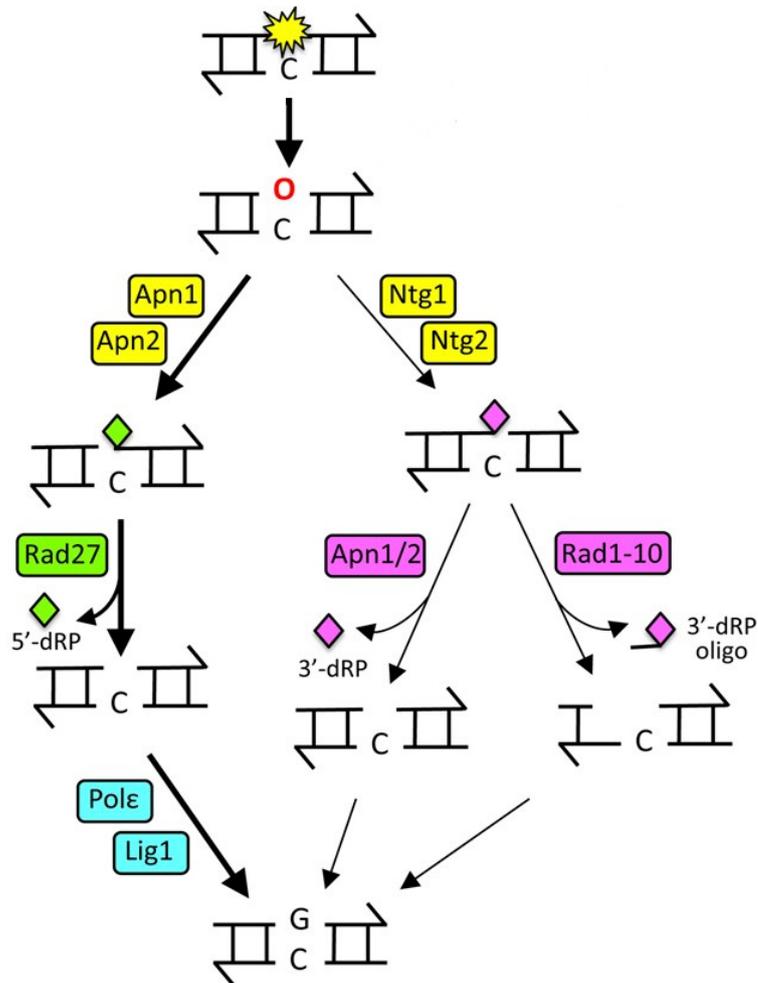


Рисунок 8. Механизм ЭРО у дрожжей по [28]

1.2.5. Мисматч репарация

В процессе репликации, в результате ошибок полимеразы, в дочернюю нить ДНК могут встраиваться некоплементарные нуклеотиды, что может привести к мутациям. У разных видов организмов найдена универсальная система, способная репарировать, хоть и с различной эффективностью, все гетеродуплексы, а также ряд систем, специфически репарирующих определенный тип гетеродуплексов в ДНК. Эта универсальная система высоко консервативна в эволюции, и гены различных видов участвующие в ней, являются гомологами. Специфические системы, участвующие в репарации определенных ошибочно спаренных оснований, в отличие от универсальной системы, могут быть уникальными для определенной группы видов, отражая особенности, характерные для метаболизма их ДНК.

Универсальная система коррекции ошибочно спаренных оснований или мисматч репарация (MMR) была открыта у *Escherichia coli* и получила название MutHLS-зависимой. Механизм бактериальной MMR был описан в 1995 году Фридбергом [37]. У *E. coli*, используются белки MutHLS, и в процессе репарации распознаются и репарируются все ошибочно спаренные основания, исключая C:C. Кроме этого, репарируются небольшие петли из нуклеотидов в одной из нитей ДНК, которые образуются в результате ошибок репликации, длина петель обычно не превышает четырех нуклеотидов.

В 1986 году с помощью синтезированного *in vitro* гетеродуплекса в клеточных экстрактах было доказано существование MMR у дрожжей [38]. В 1989 году Крамер с сотрудниками показал необходимость функционально активного белка Pms1 для нормальной коррекции искусственных гетеродуплексов у дрожжей [39]. Первичная последовательность дрожжевого белка оказалась гомологичной белку MutL *E. coli*. С использованием полимеразной цепной реакции с вырожденными праймерами, отжигающимися на наиболее консервативных участках других генов системы MutHLS у *E. coli*, были

клонированы и охарактеризованы их гомологи у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*.

Рассмотрим более подробно MMR у эукариот, на примере дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*.

MMR у эукариот происходит при участии белкового комплекса, подобного бактериальной системе MutHLS. Основным отличием MMR у эукариот, является то, что их ДНК, в отличие от бактериальной, более сложно организована и упакована, что приводит к необходимости ремодулирования структуры хроматина [37].

За распознавание повреждения ДНК в процессе MMR у эукариот отвечает гетеродимерный комплекс Msh2-Msh6, который связывается с мисматчем и представляет собой скользящий зажим, при этом Msh6 может связываться с PCNA [40, 28]. Комплекс Msh2-Msh6, связанный с мисматчем рекрутирует Mlh1-Pms1. Загрузка Mlh1-Pms1 является каталитической, при этом один комплекс Msh2-Msh6 рекрутирует несколько комплексов Mlh1-Pms1 в сайт мисматча или рядом с ним. Затем эндонуклеаза Mlh1-Pms1 активируется, при помощи PCNA, и делает надрез ДНК. На этом этапе Msh6 удерживает или рекрутирует PCNA вблизи сайта мисматча. Эксцизия ДНК опосредована экзонуклеазой Exo1. Далее брешь застраивается ДНК-полимеразой δ (Рисунок 9) [40, 41].

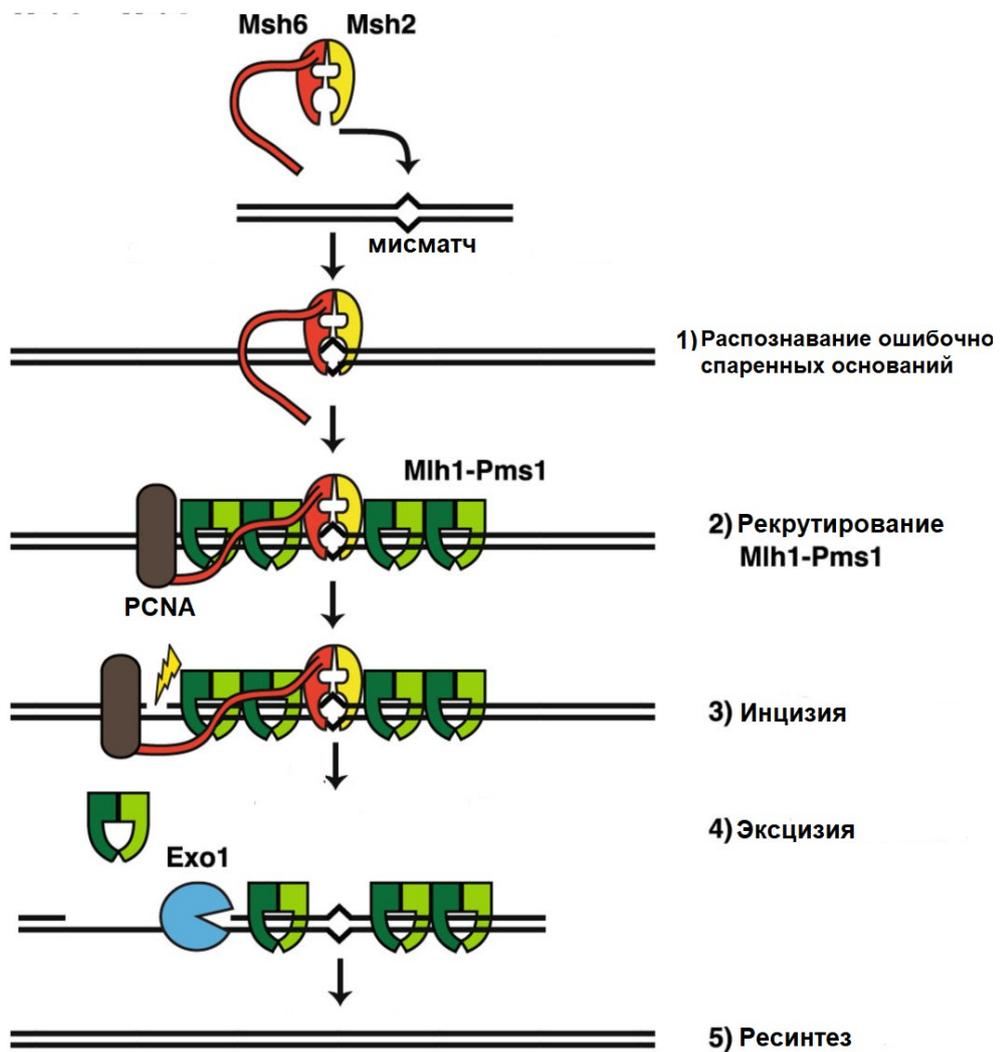


Рисунок 9. Механизм MMR [40]

С помощью основной эукариотической системы MMR, репарируются семь из восьми возможных гетеродуплексов, исключая С:С [42]. В отличие от бактерий, у которых система MutHLS не репарирует петли длиннее четырех нуклеотидов [43], у дрожжей с достаточно высокой эффективностью репарируются петли длиной от 8 до 12 нуклеотидов, но уже другим комплексом Msh2-Msh3-Mlh1-Mlh2 [44].

1.2.6. Рекомбинационная репарация

В 1968 году американцы У. Рапп и П. Ховард-Фландерс [45] исследовали облученные УФ-светом бактерии, у которых были повреждены гены, ответственные за синтез нуклеаз, вовлеченных в эксцизионную репарацию. В результате чего была невозможна эксцизионная репарация. Этот опыт проводился не на свету, тем самым исключалась фотореактивация. Несмотря на все это, репарационные процессы в клетке, все-таки происходили [45, 46]. Это говорило о наличии в клетке, как минимум, еще одной системы репарации.

Некоторые химические вещества и ионизирующая радиация могут разорвать одну или две нити ДНК.

Однонитевые разрывы (ОНР) – разрывы одной из нитей ДНК, чаще всего исправляемые ферментами, участвующими в ЭРО.

Двунитевые разрывы (ДНР) – разрывы двух нитей ДНК, эффективно инициирующие процессы рекомбинации. В норме ДНР возникают с невысокой частотой в период репликации генома, при некоторых метаболических процессах в клетке (ДНР, в данном случае индуцируются ферментами). Однако, при действии ионизирующей радиации, а также ряда химических агентов в ДНК клетки может возникать множество ДНР. Таким образом, как индуцированные внешними факторами, так и индуцированные ферментами ДНР ДНК инициируют процесс рекомбинации, приводящий к их репарации. При этом рекомбинационные и репарационные процессы объединяются в один процесс, который начинается с появления разрывов и заканчивающийся восстановлением структуры ДНК. Рекомбинационная репарация также тесно связана с процессом ремодулирования структуры хроматина и чекпойнтом (Рисунок 10) [47, 48].

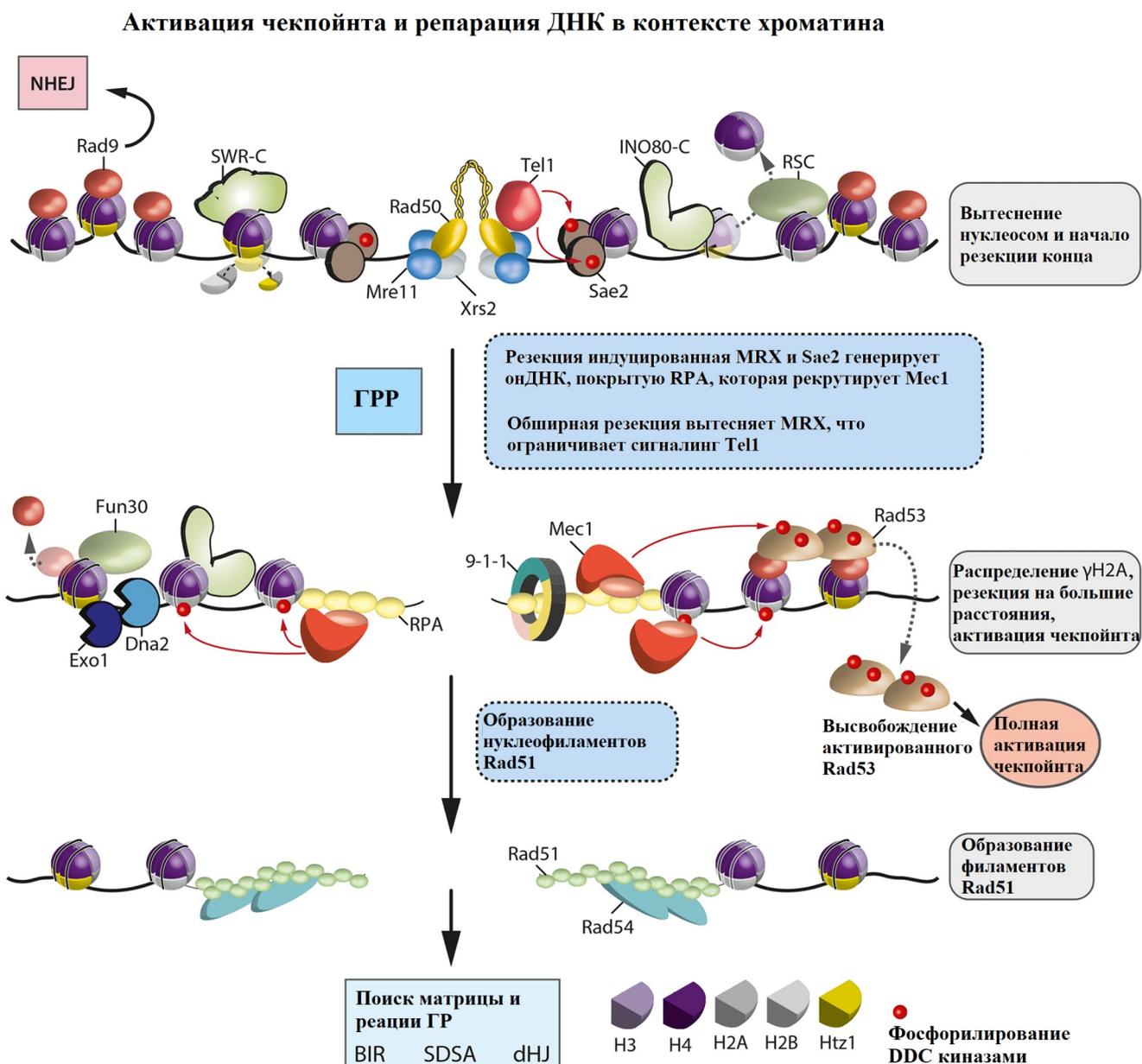


Рисунок 10. Связь рекомбинационной репарации с ремодулированием структуры хроматина и чекпойнтом [18]

Существует несколько механизмов рекомбинационной репарации, которые способны устранить ДНР ДНК: гомологичная рекомбинационная репарация (ГРР), когда поврежденная ДНК может вступить в рекомбинацию, как с гомологичной хромосомой, так и с сестринской хроматидой (в фазах S и G2), последний процесс более эффективен. Процесс рекомбинации между сестринскими хроматидами может происходить непосредственно в S фазе, как

альтернативный механизм обхода некодирующих повреждений ДНК. Также ГРР подразделяется на синтез-зависимый отжиг цепи (SDSA) и репликацию, вызванную разрывом ДНК (BIR). В случае SDSA после образования D-петли (Displacement-loop (D-loop)) и короткого синтеза ДНК (Рисунок 11), происходит высвобождение внедренной в нее нити ДНК с последующим отжигом с ближайшим свободным концом ДНК (Рисунок 12).



Рисунок 11. D-петля

SDSA может включать в себя много раундов внедрения и высвобождения нити. Данный процесс идет без кроссинговера. Процесс BIR заключается в образовании D-петли и последующим восстановлением вилки репликации. Процесс незаконной (негомологичной) рекомбинации (NHEJ), который осуществляется путем воссоединения концов разрыва. И одностранный отжиг (SSA), когда одностранные участки ДНК одного повтора отжигаются с гомологичным участком ДНК другого повтора. (Рисунок 12, 13).

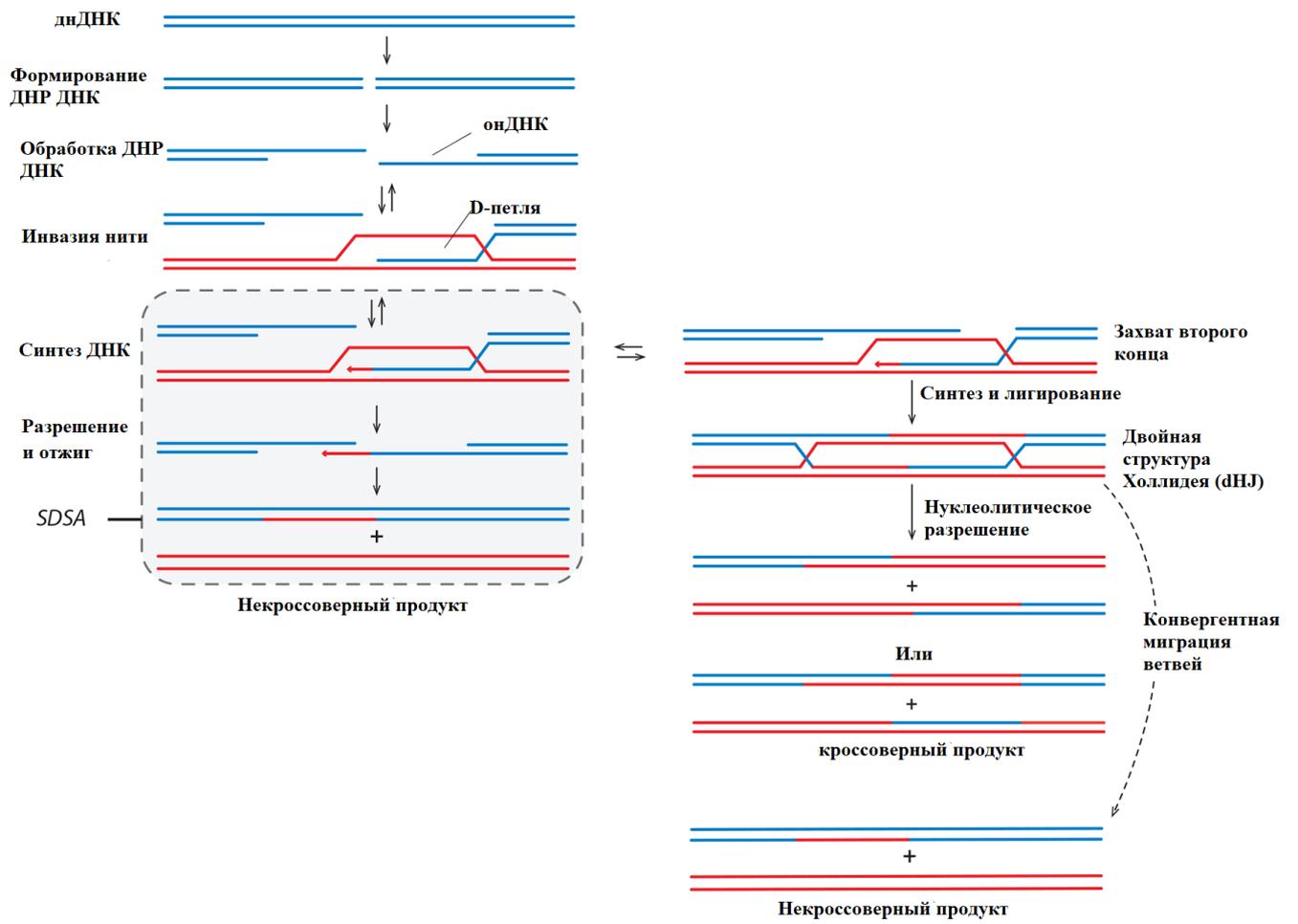


Рисунок 12. Гомологичная рекомбинационная репарация по [49]

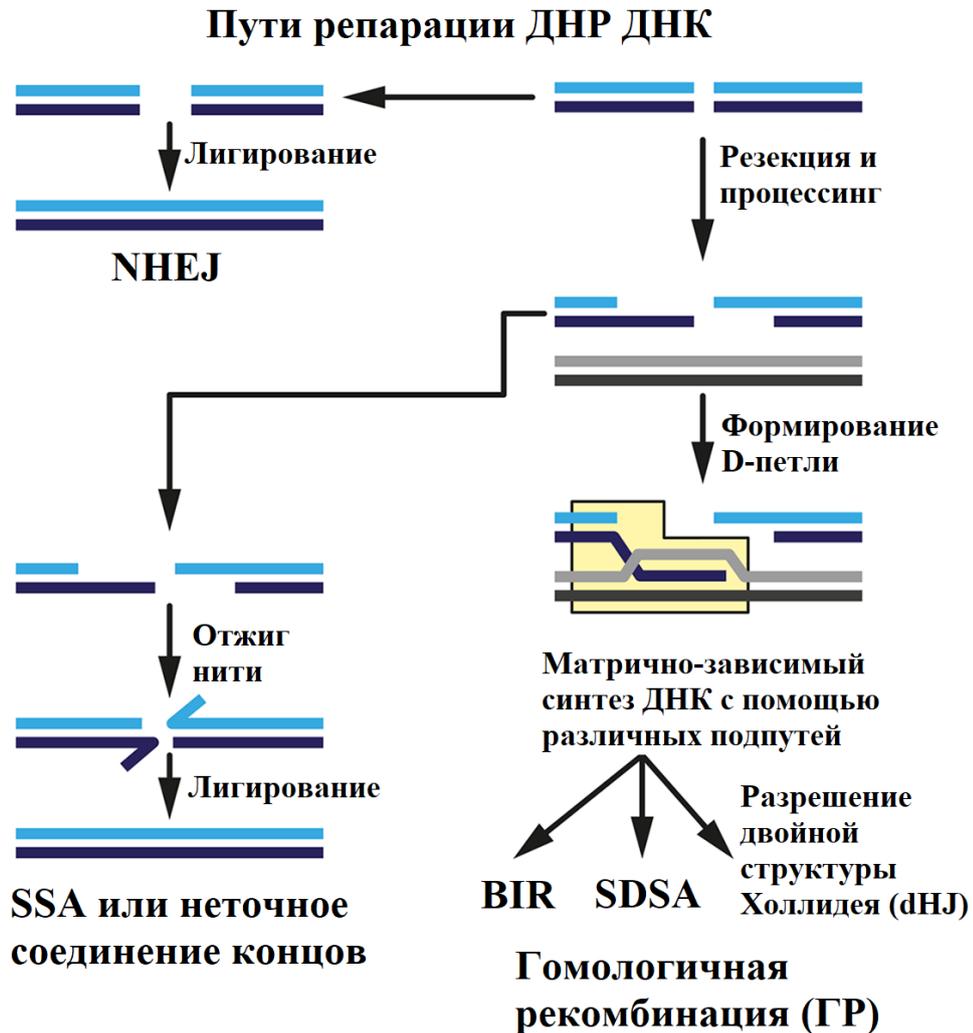


Рисунок 13. Пути репарации ДНР ДНК по [18]

Первым этапом, общим для всех путей рекомбинационной репарации, является опознавание повреждения и определение свободных концов ДНР ДНК. Далее следует процессинг 3'-концов ДНР и образование D-петли. Главными участниками образования D-петли у дрожжей являются белки Rad51p, Rad52p, Rad54p, Rad55p, Rad57p и Rpa. Rad51p представляет собой белок рекомбинации, формирующий филамент с однонитевым участком конца разорванной молекулы ДНК, процессированного после возникновения ДНР. Rad54p – фермент, отвечающий за поиск гомологии. Rad52p ключевой белок ГРР, он отвечает за инвазию нити и формирование D-петли [50]

Белок Sgs1, как специфическая нуклеаза, участвует в процессинге интермедиатов, формирующихся при ГР. Однонитевой 3'-конец объединяется с найденным участком гомологии, и, если встроенный однонитевой участок будет превышать гомологичную последовательность, он обрезается Rad1/Rad10 гетеродимерной эндонуклеазой [51, 52, 53, 54].

В случае межсестринских взаимодействий рекомбинационный процесс идет, как правило, по конверсионному пути. При этом внедрившийся однонитевой хвост немного удлиняется при помощи ДНК-Pol δ , затем D-петля разрушается, что приводит к объединению концов ДНР в результате отжига вновь синтезированного участка ДНК с комплементарной последовательностью на другой стороне ДНР. Далее происходит удаление излишков ДНК и застройка возникших брешей. Репарационный процесс заканчивается лигированием ников [55].

1.2.7. Пострепликативная репарация или толерантность к повреждениям ДНК

Термин «Толерантность к повреждению ДНК» широко используется для обозначения совокупности механизмов, с помощью которых клетки выживают при повреждениях ДНК, блокирующих вилку репликации [56].

В течение эволюции клетки приобрели механизмы, такие как эксцизионная репарация оснований и эксцизионная репарация нуклеотидов, которые репарируют большую часть повреждений ДНК [31]. Но, к сожалению, не все повреждения удаляются, некоторые сохраняются и могут стать причиной блока репликации. Чтобы запустить заблокированную вилку репликации, клетке необходимо удалить или обойти повреждение, которое останавливает репликацию, иначе это может привести к ее гибели. В этом случае наиболее предпочтительным для клетки, является обход повреждения, после которого возобновляется процесс репликации, такой обход повреждения носит название пострепликативная репарация (ПРР) [57]. Очень часто в литературе переплетаются понятия ПРР и толерантность к повреждению ДНК (ТПД), что не удивительно, ведь в процессе пострепликативной репарации повреждения, также как, и при ТПД не репарируются, а обходятся, причем, одними и теми же путями, следовательно, правильнее называть пострепликативную репарацию ТПД [56]. В дальнейшем мы будем использовать термин ПРР, так как он более привычен и описывает механизмы обхода повреждения ДНК, а не ТПД, который описывает совокупность механизмов обхода повреждения ДНК в целом.

Пострепликативная репарация разделяется на две параллельные ветви: ошибочную (TLS (TransLesion Synthesis - синтез в обход повреждений ДНК)), обусловленную обходом повреждений ДНК при помощи часто ошибающихся TLS ДНК-полимераз и безошибочную, которая осуществляется в результате переключения матрицы (TS) с использованием неповрежденной сестринской хроматиды. Обе ветви находятся под контролем генов эпистатической группы

RAD6 [58, 59].

К генам эпистатической группы *RAD6* принадлежат, в частности, *REV3*, *RAD30*, *RAD5* и *MMS2*, их продукты участвуют в пострепликативной репарации повреждений ДНК, вызванных УФ-излучением [60].

За выбор ветви ПРР, по которой будет осуществляться обход повреждений ДНК, в основном отвечают модификации PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) [61]. В том случае, если PCNA моноубиквитинирована по K164 комплексом Rad6-Rad18, то в обходе повреждения ДНК задействована ветвь TLS, если PCNA полиубиквитинирована комплексом Mms2-Ubc13-Rad5 через K63-связанные цепи, то в обходе повреждения ДНК задействована безошибочная ветвь ПРР (Рисунок 14) [62].

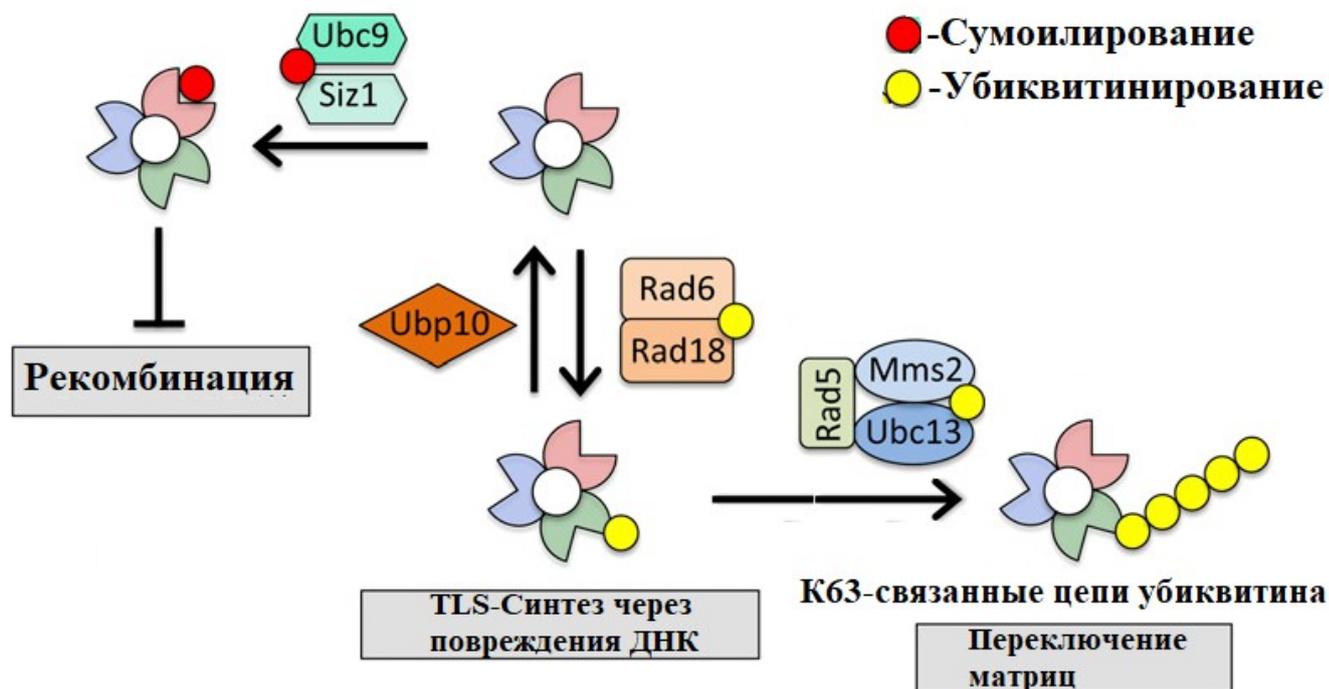


Рисунок 14. Модификации PCNA по [28]

Повреждение ДНК, мешает дальнейшему продвижению репликативной вилки и вызывает остановку клеточного цикла. В ответ на повреждение ДНК индуцируется «чекпойнт» - механизм, регулирующий остановку клеточного

цикла, и происходит инициация пути ПРР.

1.2.7.1. Инициация пути ПРР

Предполагалось, что при репликации ДНК у эукариот лидирующая нить копируется непрерывно, при этом непрерывность синтеза на поврежденной матрице объяснялась синтезом ДНК в обход повреждений (TLS) [63].

На самом деле этот процесс не является непрерывным. В работе Лопеса с соавторами [64] и другой работе Карраса и др. [65], была показана прерывистость синтеза на лидирующей цепи после облучения почкующихся дрожжей УФ-светом, а также образование длинных однонитевых брешей. Однонитевые бреши могут существовать довольно продолжительное время, и являются опасными для клетки, так как они могут подвергаться действию экзо- и эндонуклеаз, что может привести к деградации незащищенных концов бреши и возникновению двунитевых разрывов ДНК, часто приводящих к гибели клетки. Следовательно, 3'- и 5'- концы бреши должны быть защищены от действия нуклеаз, и как следствие деградации.

Защита 3'- конца бреши осуществляется репликативным комплексом, который стабилизируется в ответ на повреждение ДНК, фосфорилированием киназы Rad53. Саму брешь защищает комплекс RPA. Одновременно, RPA, связанный с ДНК, фосфорилируется киназой Mec1-Ddc2, и активно привлекает загрузчик Rad24-RFC к 5'- концу бреши, где на ДНК происходит загрузка комплекса Rad17-Mec3-Ddc1 (9-1-1), который представляет собой гетеротримерный зажим наподобие PCNA [66, 67]. Комплекс 9-1-1 связывается с 5'-концом бреши и служит еще одним активатором киназы Rad53 [68]. Одновременно он также служит защитой 5'- конца бреши от нуклеазной активности. Организованная таким образом однонитевая брешь служит субстратом для белков, иницирующих ПРР.

1.2.7.2. TLS путь

Выбор пути TLS зависит от убиквитин-конъюгирующего ферментативного комплекса Rad6-Rad18 (E2-E3), который моноубиквитинирует PCNA по K164 [62, 69]. Связывание этого комплекса с ДНК в районе остановленной вилки репликации является первым этапом ПРР.

Белок Rad18 способен связываться с одонитевой ДНК, и тем самым способствует доставке белка Rad6 к заблокированной вилке репликации, который в свою очередь доставляет к Rad18 молекулу убиквитина. Последний модифицирует PCNA, путем присоединения одной молекулы убиквитина к K164 (Рисунок 13).

Моноубикитинирование PCNA, привлекает белки TLS, которые необходимы для прямого обхода повреждения ДНК [70], к таким белкам относятся TLS ДНК-полимеразы Υ и V семейств, такие как полимеразы η (Pol η), Rev1p и полимеразы ζ (Pol ζ) [71]. В первую очередь моноубикитинирование PCNA привлекает Pol η , которую в последствии заменяет Pol δ .

ДНК-полимеразу η , кодирует ген *RAD30*, она участвует в синтезе ДНК предпочтительно напротив димеров пиримидина и редко 6-4-фотопродуктов, которые образуются в результате воздействия УФ-излучения [72]. Так как Pol η может правильно вставлять два аденина напротив димеров тимина, то ее также считают безошибочной TLS ДНК-полимеразой. Но, как и другие представители TLS ДНК-полимераз Υ -семейства, она имеет низкую процессивность, низкую точность и у нее отсутствует корректирующая экзонуклеазная активность. В следствие этого, при синтезе на неповрежденной цепи ДНК Pol η подвержена ошибкам, ее инактивация в линиях клеток мышей увеличивает скорость УФ-индуцированных мутаций, а у людей вызывает предрасположенность к вариантной форме пигментной ксеродермы и раку кожи [73].

Также Pol η взаимодействует с множеством других белков, таких как PCNA, Rad6-Rad18 и Rev1p [74].

Rev1p еще один представитель TLS ДНК-полимераз Υ -семейства, являющийся dCMP-трансферазой. Этот белок образует комплекс с субъединицами Rev3 и Rev7 полимеразы ζ . Также Rev1p имеет сродство к моноубиквитинированному PCNA и взаимодействует с многофункциональным белком Rad5, через взаимодействие С-концевого домена Rev1p с мотивом RFF на N-конце Rad5 [56, 75, 76]. Эти взаимодействия связывают белки в своеобразную платформу, с которой связывается полимеразы ζ .

В нуклеоплазме данная полимеразы чаще всего представлена двумя субъединицами Rev3 и Rev7 (каталитической и вспомогательной, соответственно). Для полноценной работы данной полимеразы необходимы еще две субъединицы Pol31 и Pol32. Последние две субъединицы также входят в состав комплекса репликативной ДНК-полимеразы δ . Предполагается, что комплекс Rev3-Rev7-Pol31-Pol32, возможно, при взаимодействии с репликативной Pol δ осуществляет склонный к ошибкам обход повреждений ДНК. Таким образом, при повреждениях ДНК вызванных УФ-светом, Pol η осуществляет, по-видимому, первый этап TLS, если Pol η не справляется с обходом повреждения, то в процесс вступает Pol ζ [74]. Одновременно с этими процессами происходит медленная реакция полиубиквитинирования PCNA. Как только завершается полиубиквитинирование PCNA, путь TLS блокируется и открывается путь безошибочной ветви ПРР [56, 69, 77].

1.2.7.3. Безошибочный обход повреждений ДНК

Безошибочный обход повреждений ДНК, осуществляется посредством переключения матриц (TS), и за счет работы репликативных ДНК-полимераз (Рисунок 15).

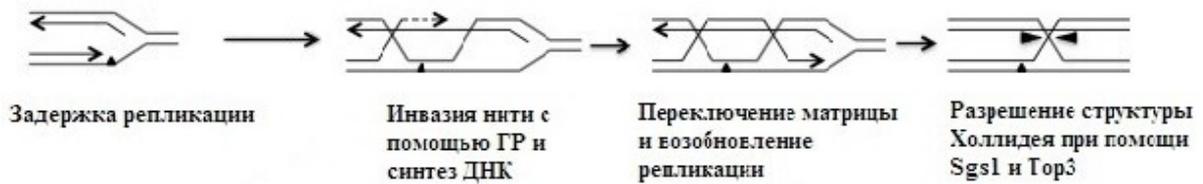


Рисунок 15. Переключение матриц

Безошибочный путь ПРР, делится на две ветви, одна из которых контролируется генами гомологичной рекомбинационной репарации, а вторая контролируется эпистатической группой генов *RAD5*.

Чтобы полиубиквитинировать PCNA, PCNA должен быть сначала моноубиквитинирован по K164 с помощью комплекса Rad6-Rad18 (E2-E3), что является началом инициации ТПД (Рисунок 14). Дальнейшее полиубиквитинирование PCNA, осуществляется комплексом Mms2-Ubc13-Rad5. В данном комплексе Rad5p работает как убиквитин-лигаза E3, а связанный с ним гетеродимер Mms2-Ubc13, функционирует как убиквитин-конъюгаза E2 [78]. Синтез полиубиквитиновой цепи осуществляется через остаток K63, связанного с PCNA. При этом к моноубиквитину присоединяется цепочка убиквитинов из 4-5 звеньев объединенных через K164 [69, 59].

При полиубиквитинировании PCNA, комплексом Mms2-Ubc13-Rad5, обеспечивается безошибочный обход повреждений ДНК, путем временного переключения синтеза с поврежденной нити на сестринскую хроматиду (TS).

Rad5p - это многофункциональный белок, он может работать не только как убиквитин-лигаза E3, но и обладает активностью геликазы [62, 59]. Благодаря своей геликазной активности, этот белок может изменять структуру репликативной вилки, в структуру «куриных лапок» (регрессия репликативной вилки), не описана у дрожжей (Рисунок 16), также Rad5p распознает поврежденную ДНК или заблокированные вилки репликации [75, 79].

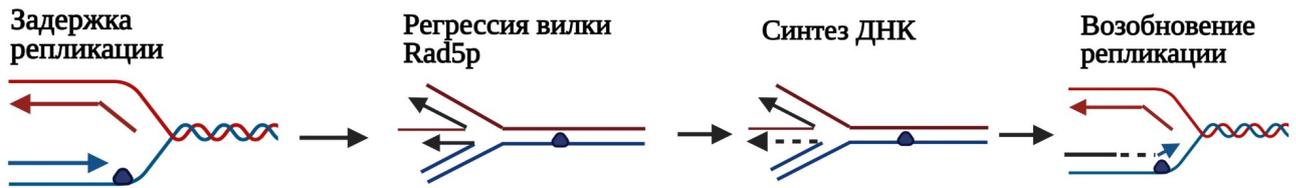


Рисунок 16. Регрессия вилки репликации (Created with BioRender.com)

Mms2 представляет собой белок, который обладает значительной гомологией с консервативным семейством убиквитин-конъюгированных белков (E2), но сам по себе он не обладает этой активностью. Его активность E2 проявляется в комплексе с убиквитин-конъюгазой Ubc13 [58].

В работе Торреса-Рамоса с сотрудниками [60], и позднее в работе Янга [61] была в определенной мере раскрыта функциональная роль полиубиквитинирования PCNA в сигнальном механизме ПРР. В экспериментах *in vitro* Торрес-Рамос с сотрудниками [60] показали, что обход повреждений ДНК Pol η зависит от длины полиубиквитиновой цепи. Так как Pol η является TLS ДНК-полимеразой, то она активируется моноубиквитинированием PCNA [61]. Однако ее полимеразная эффективность снижалась, по мере удлинения убиквитиновой цепи от одного до пяти убиквитиновых остатков. На основании полученных данных, авторы пришли к выводу, что полиубиквитинирование PCNA подавляет TLS, уменьшая активность полимераз в месте повреждения. Кроме того, полиубиквитинирование PCNA ослабляет связь Pol η с PCNA, что способствует их диссоциации, и предотвращает образование нового комплекса Pol η - PCNA. Таким образом, предполагается, что полиубиквитинирование PCNA служит в качестве сигнала, блокирующего репликацию, посредством предотвращения доступа полимераз семейства В и Y в вилку репликации [57, 61].

После полиубиквитинирования PCNA и диссоциации полимеразы Pol η , 3'-конец вновь синтезированной ДНК подвергается деградации под действием экзонуклеазной активности белкового комплекса MRX (Mre11-Rad50-Xrs2), который активно привлекается к блокированной репликативной вилке [80, 81]. Степень деградации ДНК, при этом контролируется белком Rad51. Еще одним

участником этого процесса является геликаза Pif1, которая участвует в процессинге однонитевых брешей и подготавливает однонитевой 3'-конец ДНК, для инициации рекомбинационного процесса при помощи образования D-петли [82].

На первых стадиях образования, D-петли представляют собой неустойчивые структуры, которые нуждаются в стабилизации специфическими белками и / или комплексами белков [57]. Одним из комплексов, придающих устойчивость D-петле, является SHU-комплекс, состоящий из четырех субъединиц, кодируемых генами *CSM2*, *PSY3*, *SHU1* и *SHU2* [83]. Субъединица Csm2 SHU-комплекса стимулирует ГРР, посредством физического взаимодействия с Rad55, который образует гетеродимерный комплекс Rad55-Rad57. Взаимодействие SHU-комплекса с комплексом Rad55-Rad57 препятствует активности геликазы Srs2, и тем самым облегчает образование филамента оцДНК-Rad51 [84]. Роль геликазы Srs2 почкующихся дрожжей, в данном случае, заключается в дестабилизации D-петли и ингибировании ГРР, которое основано на разрушении филамента оцДНК-Rad51, путем удаления белка Rad51 из последнего [84, 85]. Это спасает клетку от гибели, так как избыток промежуточных продуктов рекомбинации, является цитотоксичным.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Материалы

2.1.1. Штаммы дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* использованные в работе

Все штаммы, использованные в работе, происходят из коллекции лаборатории Генетики эукариот НИЦ «Курчатовский институт» - ПИЯФ или были получены в результате данной работы (Таблица 1).

Штаммы получали с использованием кассеты *natMX6*, полученной с помощью ПЦР и амплифицировали из *pFLA6A-natMX6* (Латыпов) с использованием праймеров *SML1_DelL*: 5'-

TGTCTTATCTGCTCCTTTGTGATCTTACGGTCTCACTAACCTCTCTTCAACTGCTCAATAATTTCCCGCTGCTTCGTACGCTGCAGGTCG-3'; *SML1_DelR*: 5'-

CGAGAATGACAACAATAGTAGGACGAGAGTCCCTGAAAAGAAGGGTATCTAAGAGAAGAAAAGAACAGAAGCATAGGCCACTAGTGGATC-3'; *RAD30 DelL*:

5'-

ACTTGGAAGGAGTTGATTCAGCTTGGTTCCTCCAGTAAAGCATACGAGTCCTCCTTAGCATGTATCGCCCGCTTCGTACGCTGCAGGTCG-3'; *RAD30 DelR*: 5'-

CTTGTAATAAATGATAAGATGTTTTTGGAAAGATGTAACCTTGTTTCTTCTGAGGTGTGGCAGTATGTTGTGGCATAGGCCACTAGTGGATC-3'; *MMS2_del_L*: 5'-

TCGATGTTCGTGGTGAATTCCTTATTCTGTATATGCAACGTAGAAGAAAGCAGCGTTTACASAAAAATGTCGCTTCGTACGCTGCAGGTCG-3'; *MMS2 del_R*: 5'-

TTGGAATGCTGCAAATACTGTTTAGGAAAAAGTAGATAACTAAAAGGTTTCCTTCCCTTCGGTTGACGCGCATAGGCCACTAGTGGATC-3' и *XRS2 del_L*: 5'-

ATATAAATGACAGCTTTTTATACATATAGACCCTTTGAAGAATATCCAAAC TAGAAAGGTTGATCAGAAGCTTCGTACGCTGCAGGTCG-3'; *XRS2 del_R*: 5'-

TGGTTCTTTTATGTATTAGGCTACTATTTATTTAATAACTTCGCATCTATCAA

AAGAAAAGACTGACTGTGCATAGGCCACTAGTGGATC-3';

дезоксиолигонуклеотиды, соответственно. Исходный штамм *him1Δ* получали при помощи плазмиды pUCH370 (Келберг) (см. раздел 2.2.1).

Таблица 1. Штаммы дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* использованные в работе

Штамм	Генотип	Краткое обозначение
11D-3031	<i>MATα ade2Δ-248 ura3-160, 188leu23, 112trp1</i>	<i>2α</i>
1-EAA-3031	<i>MATα ade2Δ-248 ura3-160,188 leu2-3,112 trp1 him1:: URA3</i>	<i>him1Δ</i>
6-DVF-3031	<i>MATα ade2Δ-248 ura3-160,188 leu2-3,112 trp1 sml1:: kanMX</i>	<i>sml1Δ</i>
7- DVF-3031	<i>MATα ade2Δ-248 ura3-160,188 leu2-3,112 trp1 sml1:: kanMX him1:: URA3</i>	<i>sml1Δ him1Δ</i>
4-EAA-3031	<i>MATα ade2Δ-248 ura3-160,188 leu2-3,112 trp1rad30:: kanMX</i>	<i>rad30Δ</i>
5-EAA-3031	<i>MATα ade2Δ-248 ura3-160,188 leu2-3,112 trp1rad30:: kanMX him1:: URA3</i>	<i>him1Δ rad30Δ</i>
6-EAA-3031	<i>MATα ade2Δ-248 ura3-160,188 leu2-3,112 trp1 mms2:: kanMX</i>	<i>mms2Δ</i>
7-EAA-3031	<i>MATα ade2Δ-248 ura3-160,188 leu2-3,112 trp1 mms2:: kanMX him1:: URA3</i>	<i>him1Δ mms2Δ</i>
2-TAE-3031	<i>MATα ade2Δ-248 ura3-160,188 leu2-3,112 trp1 xrs2:: URA3</i>	<i>xrs2Δ</i>
8-EAA-3031	<i>MATα ade2Δ-248 ura3-160,188 leu2-3,112 trp1 xrs2:: URA3 him1Δ</i>	<i>him1Δ xrs2Δ</i>
8-DVF-3031	<i>MATα ade2Δ-248 ura3-160,188 leu2-3,112 trp1 dun1:: kanMX</i>	<i>dun1Δ</i>
2-EAA-3031	<i>MATα ade2Δ-248 ura3-160,188 leu2-3,112 trp1 dun1:: kanMX him1:: URA3</i>	<i>dun1Δ him1Δ</i>
3-TAE-3031	<i>MATα ade2Δ-248 ura3-160, 188leu23, 112trp1 mph1:: kanMX</i>	<i>mph1Δ</i>
9-EAA-3031	<i>MATα ade2Δ-248 ura3-160, 188leu23, 112trp1 mph1:: kanMX him1:: URA3</i>	<i>mph1Δ him1Δ</i>
4-TAE-3031	<i>MATα ade2Δ-248 ura3-160, 188leu23, 112trp1 srs2::LEU2</i>	<i>srs2Δ</i>

10-EAA-3031	<i>MATα ade2Δ-248 ura3-160, 188leu23, 112trp1 him1:: URA3 srs2::LEU2</i>	<i>him1Δ srs2Δ</i>
9-DVF-3031	<i>MATα ade2Δ-248 ura3-160, 188leu23, 112trp1 pph3:: kanMX</i>	<i>pph3Δ</i>
11-EAA-3031	<i>MATα ade2Δ-248 ura3-160, 188leu23, 112trp1 pph3:: kanMX him1:: URA3</i>	<i>pph3Δ him1Δ</i>
10-DVF-3031	<i>MATα ade2Δ-248 ura3-160, 188leu23, 112trp1 psy4:: Nat</i>	<i>psy4Δ</i>
12-EAA-3031	<i>MATα ade2Δ-248 ura3-160, 188leu23, 112trp1 psy4:: Nat him1:: URA3</i>	<i>psy4Δ him1Δ</i>
9-DVF-3031	<i>MATα ade2Δ-248 ura3-160, 188leu2-3, 112trp1 him1:: URA3 rad53+HA-F</i>	<i>him1Δrad53-C</i>
10-DVF-3031	<i>MATα ade2Δ-248 ura3-160, 188leu2-3, 112trp1 rad53+HA-F</i>	<i>rad53-C</i>
13-EAA-3031	<i>MATα ade2Δ-248 ura3-160,188leu2-3, 112trp1 him1Δ mms4:: URA3</i>	<i>him1Δ mms4Δ</i>
5-TAE-3031	<i>MATα ade2Δ-248 ura3-160,188leu2-3, 112trp1 mms4:: URA3</i>	<i>mms4Δ</i>

2.1.2. Составы питательных сред

Для культивирования дрожжей использовали среды следующего состава:

Полная среда (D-среда) содержала: пептона -10 г/л, дрожжевого экстракта - 2 г/л, глюкоза -20 г/л.

Минимальная среда содержала: глюкоза 20 г/л; основные соли*; витамины и микроэлементы**.

Среда со спиртом: глюкоза -4 г/л; автолизат -4 г/л; пептон - 4 г/л; основные соли* -20 мл/л; витамины и микроэлементы** - 5 мл/л; 96% этиловый спирт 13 мл/л; аминокислотные добавки: лейцин, урацил, триптофан - 1 г/л, лизин, гистидин, метионин – 0,5 г/л.

Селективная среда: глюкоза -4 г/л; автолизат -2 г/л; пептон - 2 г/л; основные соли* -20 мл/л; витамины и микроэлементы** - 5 мл/л; ауксотрофные добавки: лейцин, урацил, лизин, гистидин, метионин – 0,5 г/л.

* основные соли (0,85 г/л KH_2PO_4 ; 0,15 г/л K_2HPO_4 ; 5 г/л $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,5 г/л

MgSO₄; 0,1 г/л CaCl₂; 0,1 г/л NaCl).

** витамины и микроэлементы (20 мкг/л биотина; 2 мкг/л пантотената кальция; 2 мкг/л фолиевой кислоты; 10 мкг/л инозита; 400 мкг/л никотиновой кислоты; 200 мкг/л парааминобензойной кислоты; 400 мкг/л пиридоксин гидрохлорида; 200 мкг/л рибофлавина; 400 мкг/л тиамин гидрохлорида; 500 мкг/л Н₃ВO₃; 40 мкг/л CuSO₄; 100 мкг/л KI; 200 мкг/л FeCl₃; 400 мкг/л MgSO₄; 200 мкг/л Na₂MoO₄; 400 мкг/л ZnSO₄).

Все плотные среды содержали 28 г/л агар-агара.

Использованные в работе штаммы дрожжей выращивались при температуре 30°C.

2.2. Методы

2.2.1. Получение мутантных штаммов

В ходе работы методом разрушения генов были получены одиночные (штамм-реципиент 11D-3031) и двойные (несущие мутацию *him1Δ* – штамм-реципиент 1-ЕАА-3031) мутанты.

Для получения мутантного штамма *him1Δ* использовали плазмиду pUCH370, полученную в работе Келберг [1] (Рисунок 17). Эта плазида содержала последовательность гена *URA3*, фланкированную небольшими последовательностями, гомологичными флангам гена *HIM1* (выделены розовым цветом). Плазмиду резали двумя рестриктазами *Bam*H1 и *Xba*1. После чего, полученные фрагменты трансформировали в штамм дикого типа 11D-3031 (ауксотрофный по урацилу), схема рекомбинации представлена на рисунке 17. И получали клетки прототрофные по урацилу. По данному признаку были отобраны мутанты, растущие на среде без урацила. Далее делецию гена *HIM1* подтверждали при помощи ПЦР.

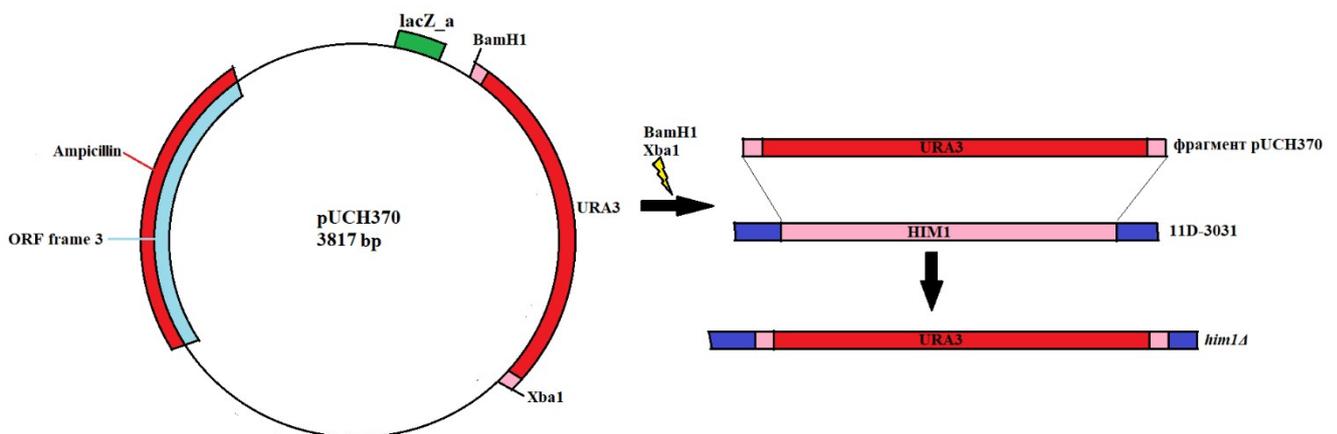


Рисунок 17. Карта плазмиды pUCH370 и схема получения делеционного мутанта *him1Δ*

2.2.2. Чувствительность к УФ-свету

Для снятия кривых выживаемость/доза брали трехдневную культуру клеток дрожжей. Получали моноклеточную суспензию клеток дрожжей в 7 мл дистиллированной воды (концентрация $2-4 \times 10^6$ клеток/мл). 5 мл суспензии вносили в чашку Петри. Облучение производили разными дозами в зависимости от чувствительности штамма к УФ - излучению. Источником УФ-излучения служила лампа БУП-30П с мощностью на верхнем уровне $1.4 \text{ Дж/м}^2 \times \text{сек}$ и на нижнем уровне - $0.21 \text{ Дж/м}^2 \times \text{сек}$. После облучения соответствующей дозой часть суспензии разводили таким образом, чтобы на чашках выросло 300-500 колоний (Рисунок 18). Для каждой дозы производили высев на три чашки по 50 мкл. Подсчет колоний производили через трое суток на трех чашках для каждой дозы. Всего ставилось 4-5 повторности для каждого штамма и каждой дозы.

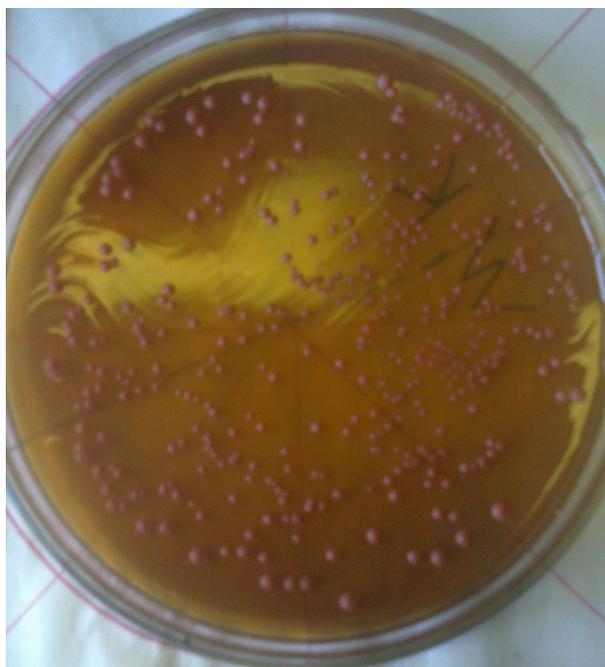


Рисунок 18. Вид колоний дрожжей на чашке Петри при снятии кривых выживаемости

2.2.3. УФ-индуцированный мутагенез

Уровень УФ-индуцированного мутагенеза оценивали по частоте возникновения прямых мутаций в генах *ADE4-ADE8*. После трех дней инкубации готовили суспензию клеток с концентрацией $4-6 \times 10^6$ клеток/мл. Для контроля после соответствующих разведений высевали 50 мкл суспензии на одну чашку со средой со спиртом. Оставшуюся исходную суспензию облучали УФ-светом в чашке Петри тремя дозами, определяющими приблизительно 50%, 10% и 1% выживаемости культуры клеток. После соответствующих разведений суспензию высевали на несколько чашек (не менее трех на дозу). Через семь дней учитывали число мутантных (белых крупных колоний) общее число выживших (красные и белые) и подсчитывали частоту возникновения мутантов (Рисунок 19).



Рисунок 19. Вид мутантной колонии на чашке Петри

2.2.4. Выделение хромосомной ДНК из клеток дрожжей

Выделение хромосомной ДНК из клеток дрожжей производили следующим образом:

1-1,5 суточную культуру клеток дрожжей, выращенную в жидкой D-среде, откручивали на центрифуге 5 мин при 2000 об/с. К полученному осадку добавляли 400 мкл дистиллированной воды, и полученную суспензию переносили в пробирку «Эппендорф» на 1,5 мл. Далее откручивали на центрифуге 30 сек при 8000 об/с, сливали надосадочную жидкость. К полученному осадку добавляли 150 мкл раствора (50мМ Трис (pH=8) + 20 мМ ЭДТА) и ~100 мкл стеклянных шариков, затем разбивали осадок и помещали пробирки «Эппендорф» на «Мультивортекс» (фирмы Biosan) и трясли на нем пробирки «Эппендорф» 10 мин с небольшими перерывами. Затем к образовавшемуся клеточному субстрату добавляли 150 мкл фенол-хлороформа и 20 мкл SDS и перемешивали 1 час на «вертушке» (фирмы Biosan). Далее центрифугировали 15 мин при 8000 об/с. Отбирали верхнюю (водную) фазу ~200 мкл и осаждали ДНК двумя объемами 96% этанола (400 мкл) с добавлением 20 мкл ацетата натрия или калия. Центрифугировали 1 мин при 8000 об/с и сливали надосадочную жидкость. Осадок промывали 200 мкл 70% этанола. Центрифугировали и сливали спирт. Осадок просушивали 10-15 мин (до испарения капель спирта). И растворяли 50 мкл TE. Далее для наработки нужного фрагмента ДНК, ставили ПЦР.

2.2.5. ПЦР

Полимеразная цепная реакция осуществлялась с помощью амплификатора «Mastercycler personal» фирмы “Eppendorf”. Реакция производилась в объеме равном 25 мкл и содержала: стандартный 10-кратный буфер для Tag-полимеразы (10 мМ Трис-HCl pH=8.3; 50 мМ KCl; 25 мМ MgCl₂), 10 мМ dNTP, 1 мкМ каждого праймера, 1 мкг матричной ДНК, 0.1 ед/мкл ДНК-полимеразы Tag. ПЦР

ставилась при следующих условиях:

Первичная денатурация - 94°C, 180 с.

Денатурация - 94°C, 30 с

Отжиг праймеров - 55°C, 30 с (Температура отжига праймеров рассчитывается исходя из количества А и Т умноженное на 2 и прибавляется количество G и C умноженное на 4 ($T_{отж\ расч.} = (\Sigma CG \times 4) + (\Sigma AT \times 2)$), При этом температура отжига для постановки реакции берется на 5-10°C ниже чем $T_{отж\ расч.}$)

Синтез ДНК - 72°C, 60с

Для контроля методом электрофореза использовали 1/10 объема реакционной смеси.

2.2.6. Спектры мутаций устойчивости к канаванину

Суспензии дрожжевых клеток облучали УФ-светом при 210 Дж / м². Затем клетки высевали на селективную среду с канаванином. Независимые устойчивые к канаванину клоны переносили на свежую среду с канаванином. Геномную ДНК выделяли из очищенных колоний *can^R* с использованием процедуры лизиса стеклянными шариками. Часть локуса *can^R*, содержащая 800 п.н., была амплифицирована, и проведен анализ последовательности ДНК геномных фрагментов, амплифицированных с помощью ПЦР (анализ последовательности был выполнен с помощью компании «Бигль» с использованием праймеров 5'-CACAACCCTCTTTCACGACG-3 и 5'-GGAAACCCAACCTAAGAACC-3').

2.2.7. Учет возникновения спонтанных мутаций устойчивости к канаванину

Учет спонтанных мутаций устойчивости к канаванину проводился двумя методами: 1) методом упорядоченного посева (Ленинградский тест [86]) и 2) флуктуационный тест (метод медиан [87]).

Первый метод позволяет учитывать ошибки репарации и позволяет вести учет мутаций в генах, контролирующих различные этапы репарационных механизмов. Второй метод позволяет учитывать частоту спонтанных мутаций, обусловленных ошибками репликации.

Для изучения спонтанного мутагенеза методом «Упорядоченный посев» брали культуру и переносили ее в 2 мл жидкой D-среды и оставляли на два-три дня. После этого в чашку Петри добавляли 1 мл суспензии и разбавляли его 4 мл дистиллированной воды. Наносили получившуюся суспензию на 5 чашек со средой с канаванином при помощи репликатора со 150 стержнями и оставляли в термостате на 2 недели. По истечении 2 недель производили подсчет вторичных мутантных колоний (К), вырезали 5 штук пятен без вторичных колоний. Потом помещали эти кусочки агара в 1 мл дистиллированной воды и подсчитывали количество клеток (n) в камере Горяева. Определяли количество клеток на чашке ($A = ((n/20) \times 10^6) \times 30$) и вычисляли частоту мутагенеза К/А.

Для изучения спонтанного мутагенеза методом «Коулсоновский тест» брали трех-четырёхдневную культуру 12 отдельных клонов суспензировали в чашке с лунками, в 12 лунках соответственно.

Далее:

1. Из лунки брали 5 мкл суспензии и переносили в 10 мл дистиллированной воды;
2. Из той же лунки брали 100 мкл суспензии и сеяли на чашку Петри со средой с канаванином (Can);
3. Из пробирки (см. п. 1) брали по 50 мкл и рассеивали на 2 чашки с D-средой;
4. Повторяли пункты 1, 2 и 3 для всех лунок.

Подсчет результатов производили через 3-4 суток. Считали число колоний на чашках с D-средой, число колоний на среде с канаванином. Вычисляли:

$$frequency = \frac{\text{Числ} \times \text{околонийна средес Cap}}{\text{Число колоний на D среде} \times 20000}$$

Находили *frequency* среднее и вычисляли:

$$Rate = \frac{0.4343 \times freq .\text{среднее}}{\lg (\text{Число колоний на D среде} \times 20000)}$$

2.2.8. Выделение тотальной РНК из клеток дрожжей

Выделение тотальной РНК из клеток дрожжей производили двумя способами:

1) Для выделения РНК из 1-1,5 суточной культуры клеток дрожжей использовали набор Qiagen RNeasy Mini kit с применением стеклянных шариков для разрушения клеточной стенки дрожжей.

2) Выделение РНК из клеток дрожжей производили следующим образом: 1-1,5 суточную культуру клеток дрожжей, выращенную в жидкой D-среде, откручивали на центрифуге 5 мин при 2000 об/с. К полученному осадку добавляли 400 мкл дистиллированной воды, и полученную суспензию переносили в пробирку «Эппендорф» на 1,5 мл. Далее откручивали на центрифуге 30 сек при 8000 об/с, сливали надосадочную жидкость. К полученному осадку добавляли 150 мкл ТЕ-буфера и ~100 мкл стеклянных шариков, затем разбивали осадок и помещали пробирки «Эппендорф» на «Мультивортекс» (фирмы Biosan) и трясли на нем пробирки «Эппендорф» 10 мин с небольшими перерывами. Затем к образовавшемуся клеточному субстрату добавляли 150 мкл фенол-хлороформа и 20 мкл SDS и перемешивали 1 час на «вертушке» (фирмы Biosan). Далее центрифугировали 15 мин при 8000 об/с. Отбирали верхнюю (водную) фазу ~200 мкл и осаждали РНК двумя объемами 96% этанола (400 мкл) с добавлением 20 мкл ацетата натрия или калия. Центрифугировали 1 мин при 8000 об/с и сливали надосадочную жидкость. Осадок промывали 200 мкл 70% этанола. Центрифугировали и сливали спирт. Осадок просушивали 10-15 мин (до

испарения капель спирта). После к осадку добавляли 50 мкл ddH₂O для растворения осадка, далее добавляли 25 мкл 15N раствора LiCl и ставили в морозилку на -20°C на 20 мин. Далее центрифугировали 5 мин при 8000 об/с, сливали надосадочную жидкость и промывали осадок 200 мкл 70% этанола. Осадок просушивали 10-15 мин (до испарения капель спирта). И растворяли в ddH₂O объемом примерно 50 мкл. Далее производили измерение концентрации РНК нг/мкл для дальнейшей обработки ДНКазой, после чего еще раз производили измерение концентрации РНК нг/мкл и проводили обратную транскрипцию для получения кДНК из расчета 600 нг РНК на реакцию.

2.2.9. Получение кДНК

Комплементарную ДНК (кДНК) получали, проводя, реакцию обратной транскрипции с РНК-матрицы, полученной в пункте 2.2.8., при помощи набора реактивов MMLV RT kit (Евроген, Россия).

2.2.10. ПЦР в реальном времени

Для проведения ПЦР в реальном времени была использована система детекции RT-PCR CFX96 (Bio-Rad, Великобритания). Реакции проводили в 25 мкл объемах, состоящих из 10 мкл 2.5-кратной реакционной смеси для ОТ-ПЦР в присутствии красителя SYBR Green I и эталонного красителя Rox (Syntol, Россия), 13.8 мкл воды, 1.0 мкл кДНК и 0.1 (2 мМ) соответствующих праймеров (праймеры для гена *RNR3*: For*RNR3* 5'-ACACCTTTCATGGTTTATAAG-3' и Rev*RNR3* 5'-CGACGATTTTCACAACATAA-3'; для гена *ACT1*: For*ACT1* 5'-GAAGGTCAAGATCATTTGC-3 и Rev*ACT1* 5'-GTTGGAAGGTAGTCAAAG-3').

Условия амплификации ПЦР были следующими: 1 цикл по 5 минут при 95°C, затем 39 циклов по 15с при 95°C и 20с при 52°C (Рисунок 20). Анализ кривой плавления показал 5-секундное увеличение на 1°C с 55° до 95°C.

Контрольные реакции с праймером и без матрицы реакционных смесей были включены. Два биологических и три технических повтора были выполнены для каждого образца. Результаты были обработаны с использованием программы CFX Manager.

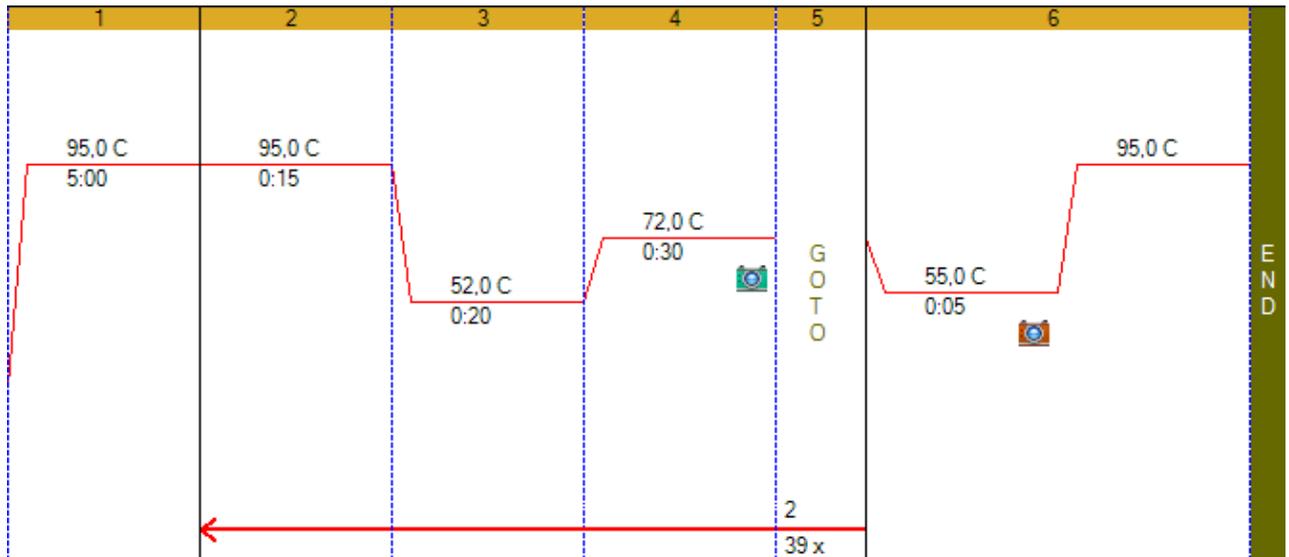


Рисунок 20. Условия проведения ПЦР в реальном времени

2.2.11. Трансформация дрожжевых клеток

Для получения двойных мутантов методом трансформации «Трансформация дрожжей литиевая» на ночь ставили инокулюм (в 5 мл жидкой D среды помещали 1 колонию дрожжей). Далее к 35 мл D среды в большой пробирке добавляли 5 мл инокулюма. Оставляли на качалке 2.5-3 часа. Потом 40 мл культуры центрифугировали в 100 мл ц/ф стакане при 3000 оборотах 1-2 мин., сливали надосадочную жидкость, добавляли 5 мл TE pH=7.5, центрифугировали и сливали надосадочную жидкость, к осадку добавляли 1.3 мл TE pH=7.5+0.1M LiCl. Переливали в пробирку. Пробирку помещали в термостат на 1 час при 30°C, несколько раз встряхивали. Далее центрифугировали 2 мин. При 2000 оборотах. Отбирали буфер сверху, оставляя его примерно 50 мкл. Добавляли фрагмент

ДНК, содержащий маркерный ген, фланкированный последовательностью, разрушаемого гена, и оставляли в термостате при 30° С на 30 мин. (встряхивали 2-3 раза). Потом добавляли 100-120 мкл ПЭГ и оставляли еще на 60 мин в термостате. Потом термошок (нагрев до 42°С 5 мин. потом резкое охлаждение) и рассеивали на селективную среду. Когда на селективной среде выросли колонии, пересеивали их еще один раз на селективную среду, чтобы убедиться, что вместо удаляемого гена встроился ген, кодирующий аминокислоту в случае ауксотрофности / или ген устойчивости к антибиотику). Полученные трансформанты подтверждались ПЦР ДНК из района рамки считывания разрушенного гена.

2.2.12. Статистические методы обработки результатов

Для обработки полученных в ходе работы результатов использовали стандартные статистические методы [88]. Наличие и отсутствие различий между выборками данных оценивали с помощью критерия Стьюдента. При изучении летального действия какого-либо мутагена, находили среднюю выживаемость с ее доверительной оценкой для каждой дозы:

$$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n}, \quad (1)$$

где \bar{x} – средняя выживаемость;

x_i – значение выживаемости в различных повторностях опыта;

n – число повторностей.

Затем рассчитывали ошибку выборки этого среднего значения:

$$m_{\bar{x}_i} = \frac{\sigma}{\sqrt{n}}, \quad (2)$$

где,

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum(\bar{x} - x_i)^2}{n - 1}} \quad (3)$$

Доверительный интервал определялся величиной:

$$y = m_x \times t, \quad (4)$$

где y – доверительный интервал;

t – коэффициент Стьюдента, который брался из таблицы для данного n и уровня значимости 0,05.

Графики строили по среднему значению выживаемости и интенсивности мутагенеза, а доверительный интервал обозначен на графиках в виде границ [89].

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1. Отношение гена *HIM1* к контролю безошибочной ветви пострепликативной репарации

Пострепликативная репарация подразделяется на две ветви: ошибочную и безошибочную. За выбор ветви, по которой пойдет пострепликативная репарация отвечает убиквитинирование PCNA. Если PCNA моноубиквитинирован по K164 комплексом Rad6-Rad18, то происходит ошибочный обход повреждения ДНК. Если после этого происходит полиубиквитинирование того же лизина через K63-связанные цепи, при помощи комплекса Mms2-Ubc13-Rad5, то происходит безошибочный обход повреждения ДНК.

Ранее сотрудниками нашей лаборатории было сделано предположение, что ген *HIM1* участвует в рекомбинационной ветви пострепликативной репарации. Для того, чтобы строго доказать участие гена *HIM1* в контроле безошибочной ветви пострепликативной репарации, мы провели генетический анализ взаимодействия мутации *him1Δ* с мутациями, инактивирующими гены *MMS2* и *XRS2*, которые контролируют начальный этап инициации безошибочного обхода повреждения ДНК во время пострепликативной репарации [90].

3.1.1. Взаимодействие мутации *mms2Δ* с мутацией *him1Δ*

При анализе взаимодействия мутации *him1Δ* с мутацией *mms2Δ*, нами было показано, что частота УФ-индуцированного мутагенеза у двойного мутанта *mms2Δ him1Δ* совпадает с частотой индуцированного мутагенеза у одиночного мутанта *mms2Δ*, это говорит об эпистатическом взаимодействии данных мутаций (Рисунок 21), и показывает, что *him1*-зависимый УФ-индуцированный мутагенез зависит от убиквитин-лигазного комплекса Mms2-Ubc13-Rad5 [90].

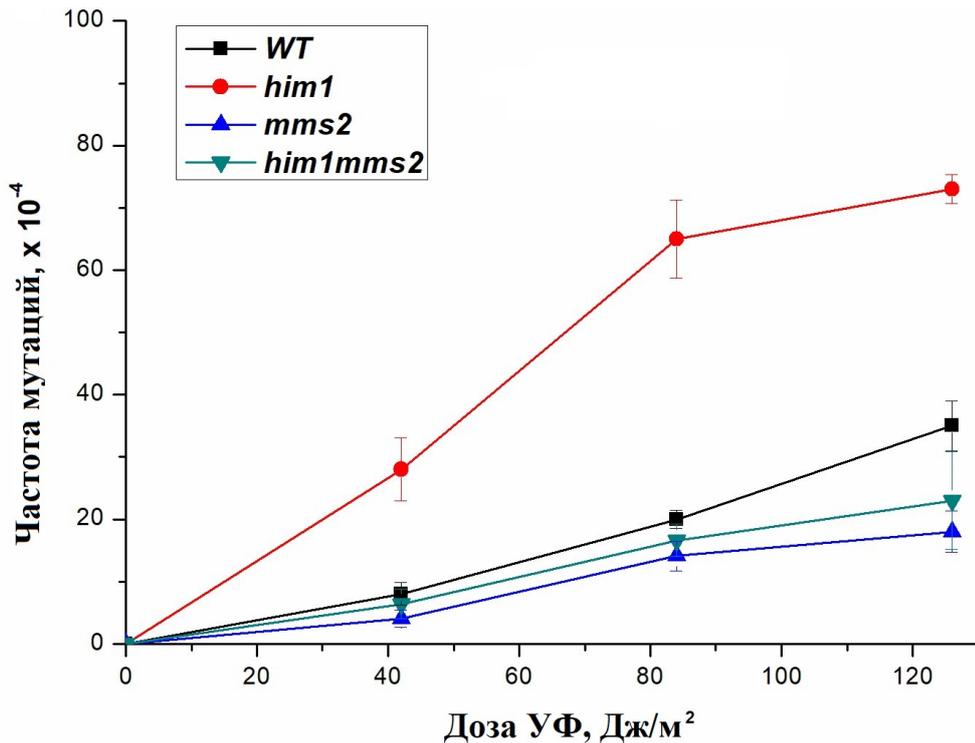


Рисунок 21. УФ-индуцированный мутагенез в локусах *ADE4-ADE8* у штамма дикого типа (11D-3031) и мутантов *him1Δ* (1-EAA-3031), *mms2Δ* (6-EAA-3031) и *him1Δ mms2Δ* (7-EAA-3031). На графике нанесены средние значения \pm SEM, полученные в 4 независимых экспериментах [90]

3.1.2. Взаимодействие мутации *xrs2Δ* с мутацией *him1Δ*

Так же нами был проведен генетический анализ взаимодействия мутации *him1Δ* с мутацией *xrs2Δ* (продукт гена *XRS2* входит в комплекс MRX (Mre11-Rad50-Xrs2)). Было показано, что частота УФ-индуцированного мутагенеза у двойного мутанта *xrs2Δ him1Δ* не отличается от частоты одиночного *xrs2Δ* (Рисунок 22), и тем самым показывает, что *him1*-зависимый УФ-индуцированный мутагенез находится под контролем комплекса MRX [90]. Таким образом, полученные данные доказывают функционирование гена *HIM1* в безошибочной ветви ПРР.

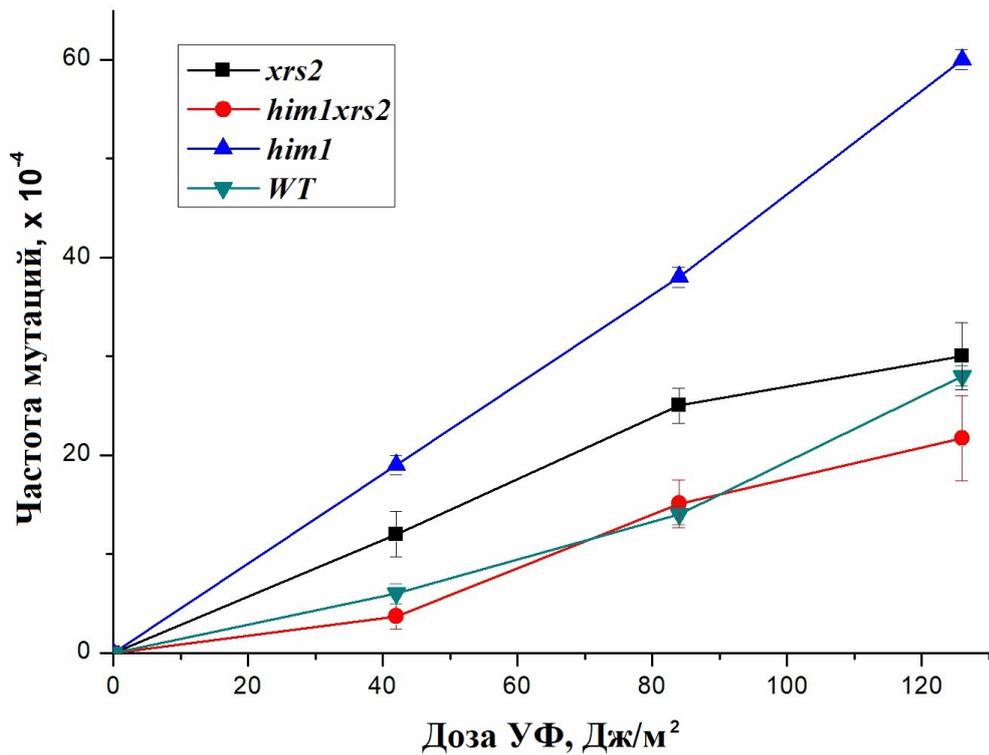


Рисунок 22. УФ-индуцированный мутагенез в локусах *ADE4-ADE8* у штамма дикого типа (11D-3031) и мутантов *him1Δ* (1-EAA-3031), *xrs2Δ* (2-TAE-3031) и *him1Δ xrs2Δ* (8-EAA-3031). На графике нанесены средние значения \pm SEM, полученные в 4 независимых экспериментах [90]

3.2. Участие продукта гена *HIM1* в стабилизации D-петли

Было показано, что продукт гена *HSM3*, который вместе с *HIM1* входит в одну эпистатическую группу генов, участвует в стабилизации D-петли [91]. Основываясь на этих данных, мы проверили участвует ли продукт гена *HIM1* также в ее стабилизации. Для этого мы провели генетический анализ взаимодействия мутации *him1Δ* с мутациями *tph1Δ*, *srs2Δ* и *mms4Δ*, которые участвуют в процессинге D-петли.

3.2.1. Взаимодействие мутации *mph1Δ* с мутацией *him1Δ*

Известно, что ген *MPH1* участвует в контроле безошибочной ветви пострепликативной репарации [92]. Он кодирует геликазу Mph1, которая способна разрушать вновь образовавшиеся D-петли.

При анализе частоты УФ-индуцированных мутаций у штамма с одиночной делецией гена *MPH1* и штамма с двойной делецией генов *MPH1* и *HIM1*, было показано, что введение делеции гена *HIM1* в штамм с делецией по гену *MPH1* подавляет частоту *him1*-зависимого УФ-индуцированного мутагенеза (Рисунок 23) [93].

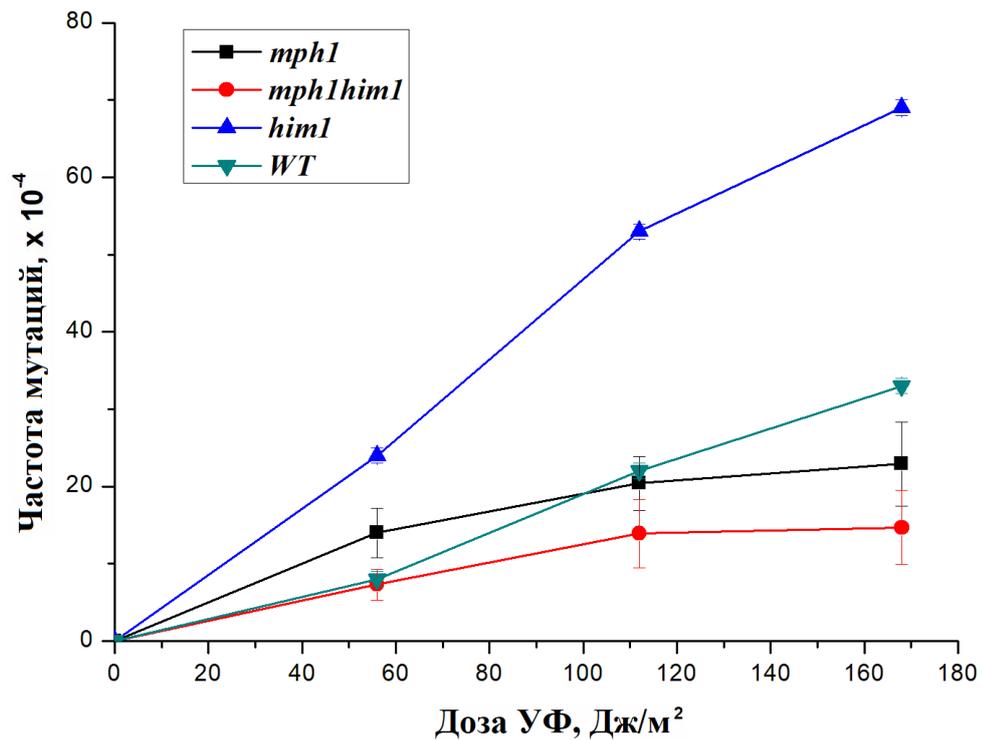


Рисунок 23. УФ-индуцированный мутагенез в локусах *ADE4-ADE8* у штамма дикого типа (11D-3031) и мутантных штаммов *him1Δ* (1-EAA-3031), *mph1Δ* (3-TAE-3031) и *mph1Δ him1Δ* (9-EAA-3031). На графике нанесены средние значения \pm SEM, полученные в 4 независимых экспериментах [93]

3.2.2. Взаимодействие мутации *srs2Δ* с мутацией *him1Δ*

В разрешении D-петель работает несколько геликаз, Mph1 одна из них. В связи с этим, мы провели так же генетический анализ взаимодействия делеции в гене *HIM1* с делецией по гену *SRS2*, кодирующему геликазу Srs2, которая способна разрушать филаменты оцДНК-Rad51, тем самым препятствуя образованию D-петли [84, 77]. Она также участвует в контроле безошибочной ветви пострепликативной репарации. Делеция гена *SRS2*, приводит к увеличению количества продуктов рекомбинации, которые в большом количестве токсичны, и могут привести к гибели клетки.

Чувствительность исследуемых штаммов к УФ-свету значительно различалась. Одиночный мутант *srs2Δ*, обладал большей чувствительностью к УФ-свету по сравнению с двойным мутантом *him1Δ srs2Δ*, у которого чувствительность к УФ-свету практически совпадала с таковой у штамма дикого типа (Рисунок 24А).

У двойного мутанта *him1Δ srs2Δ* частота УФ-индуцированного мутагенеза, практически не отличалась от таковой у одиночного мутанта *srs2Δ*. Также, в двойном мутанте наблюдалось полное подавление *him1*-зависимого УФ-индуцированного мутагенеза (Рисунок 24Б).

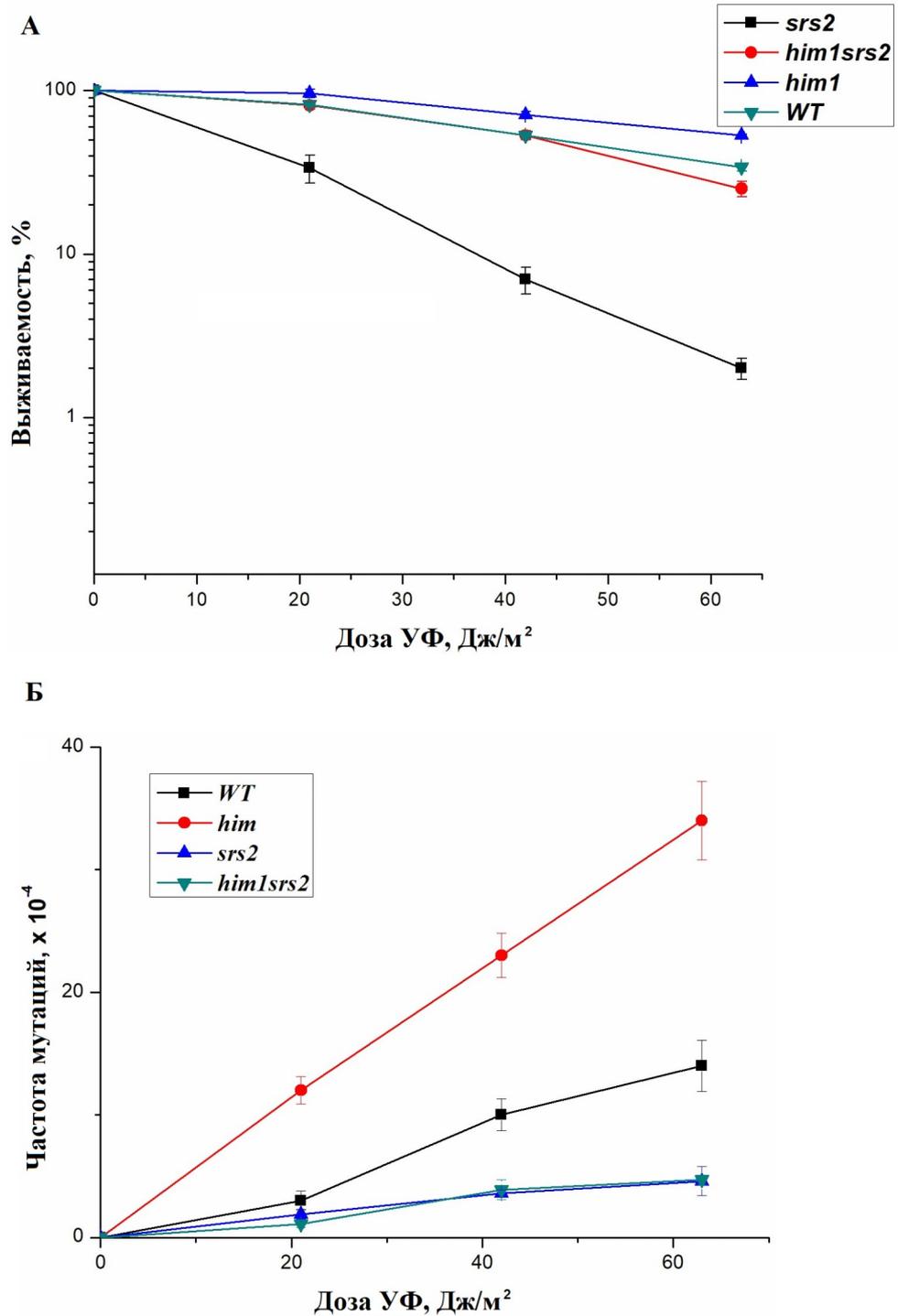


Рисунок 24. А) Чувствительность к УФ-свету и Б) УФ-индуцированный мутагенез в локусах *ADE4-ADE8* у штамма дикого типа (11D-3031) и мутантных штаммов *him1Δ* (1-EAA-3031), *srs2Δ* (4-TAE-3031) и *him1Δ srs2Δ* (10-EAA-3031). На графике нанесены средние значения \pm SEM, полученные в 4 независимых экспериментах [93]

3.2.3. Взаимодействие мутации *mms4Δ* с мутацией *him1Δ*

Ген *MMS4* кодирует субъединицу Mms4, структурно-специфичного эндонуклеазного комплекса Mus81-Mms4 [94], который также участвует в контроле безошибочной ветви ПРР. Этот комплекс требуется для разрешения промежуточных продуктов рекомбинации (двойная структура Холидея и др.), возникающих в процессе репарации поврежденной ДНК [94, 95]. При совмещении мутации *him1Δ* с мутацией *mms4Δ*, у двойного мутанта *him1Δ mms4Δ* наблюдается снижение частоты *him1*-зависимого УФ-индуцированного мутагенеза, до уровня дикого типа (Рисунок 25).

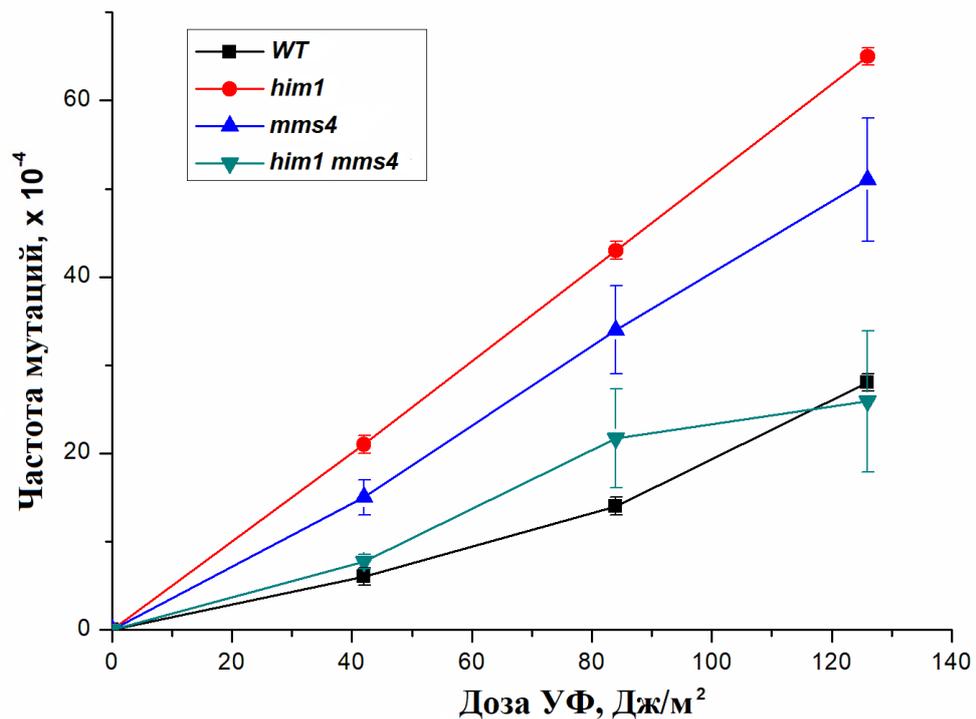


Рисунок 25. УФ-индуцированный мутагенез в локусах *ADE4-ADE8* у штамма дикого типа (11D-3031) и мутантных штаммов *him1Δ* (1-EAA-3031), *mms4Δ* (5-TAE-3031), *him1Δ mms4Δ* (13-EAA-3031). На графике нанесены средние значения \pm SEM, полученные в 4 независимых экспериментах

3.3. Взаимодействие генов *HIM1* и *RAD30*

Ген *RAD30* кодирует полимеразу η (Pol η). Это TLS ДНК-полимераза γ -семейства ДНК-полимераз [70]. Pol η способна заменять репликативную ДНК-полимеразу δ (Pol δ), после моноубиквитинирования PCNA. Для нормальной работы обеих полимераз необходим PCNA [96]. Основной функцией Pol η считается практически безошибочный обход повреждений ДНК, образовавшихся под воздействием УФ-света (димеры пиримидинов, 6-4-фотопродукты), в процессе пострепликативной репарации. Предполагается, что эта полимераза может принимать участие в заполнении одностранных брешей ДНК, образующихся в процессе репарации. Мы предположили, что *him1*-зависимый мутагенез может быть следствием переключения высокоточных полимераз на часто ошибающуюся Pol η . Для выяснения такой возможности мы осуществили ряд экспериментов.

3.3.1. Взаимодействие мутации *rad30Δ* с мутацией *him1Δ*

Мы изучили частоту УФ-индуцированных мутаций у двойного мутанта *him1Δ rad30Δ* и одиночных мутантов *him1Δ* и *rad30Δ*. Как видно из Рисунка 26, введение мутации *rad30Δ* в мутантный штамм *him1Δ* полностью подавляет *him1*-зависимый УФ-индуцированный мутагенез. Это показывает, что Pol η может быть причиной *him1*-зависимого мутагенеза.

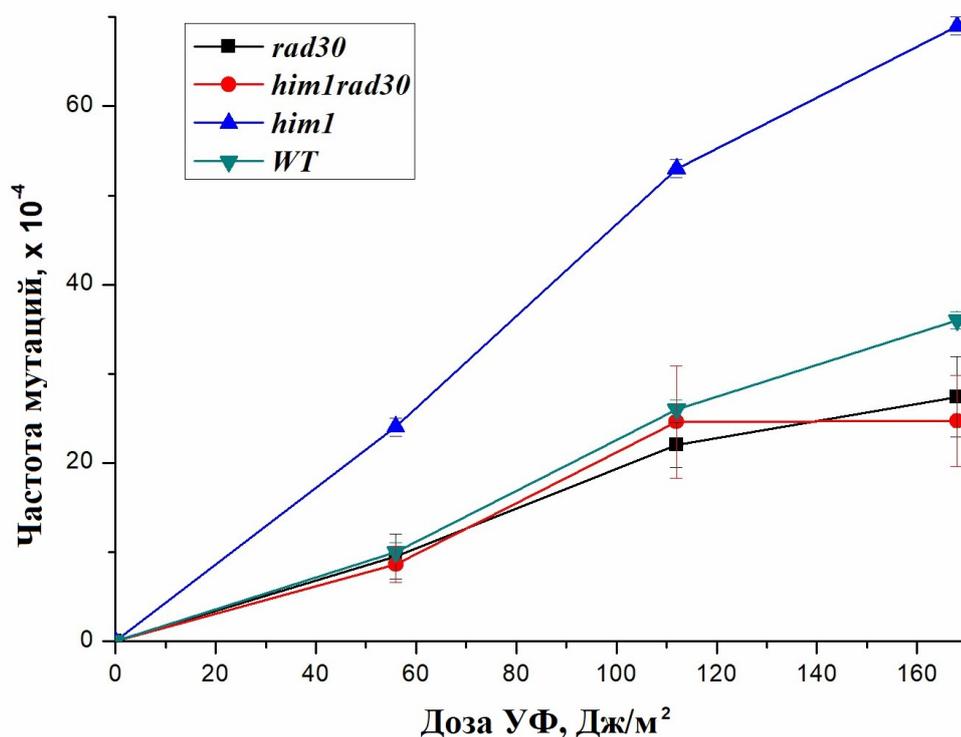


Рисунок 26. УФ-индуцированный мутагенез в локусах *ADE4-ADE8* у штамма дикого типа (11D-3031) и мутантных штаммов *him1Δ* (1-EAA-3031), *rad30Δ* (4-EAA-3031) и *him1Δ rad30Δ* (5-EAA-3031). На графике нанесены средние значения \pm SEM, полученные в 4 независимых экспериментах [90]

Для подтверждения высказанного утверждения мы провели анализ спектра мутаций в локусе *CAN1* у штаммов *him1Δ rad30Δ* и *him1Δ*, после облучения их УФ-светом при дозе 210 Дж/м².

3.3.2. Изучение спектра мутаций в локусе устойчивости к канаванину у мутантов *him1Δ* и *him1Δ rad30Δ*

Нами было выделено 200 мутантов устойчивых к канаванину после облучения штаммов *him1Δ rad30Δ* и *him1Δ* УФ-светом дозой 210 Дж/м².

Известно, что в течение TLS мутации возникают в сайтах димеров пиримидина. Мутации в сайтах, где нет соседствующих пиримидинов, (небипиримидиновые сайты) практически не индуцируются УФ-светом. Последовательность гена *CAN1* содержит 77% бипиримидиновых и 23% небипиримидиновых сайтов (NBP) [97].

УФ-индуцированные спектры мутаций, возникающие в штаммах *him1Δ* и *him1Δ rad30Δ* характеризуются преобладанием замены только одного основания (Таблица 2; Рисунки 27, 28).

Таблица 2. Изменения последовательности ДНК у УФ-индуцированных мутантов *can1^R* в штаммах *him1Δ* и *him1Δ rad30Δ* [90]

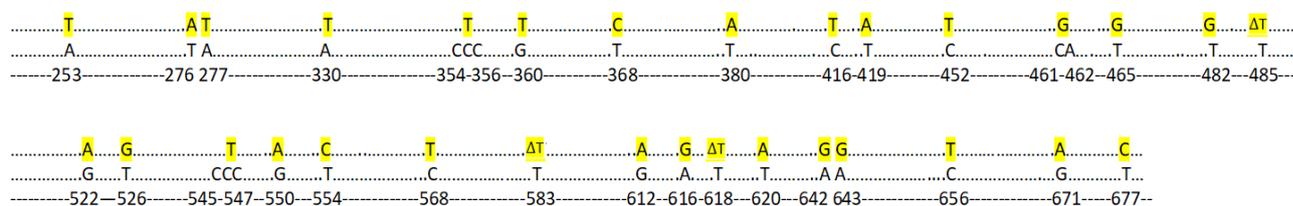
Тип мутации	<i>him1Δ</i>		<i>him1Δ rad30Δ</i>	
	n (%)	f × 10 ⁻⁵	n (%)	f × 10 ⁻⁵
Замены оснований	28 (74)	23	16 (70)	7.0
Сдвиг рамки	4 (11)	3.4	5 (22)	2.2
Тамдемные повторы	4 (10)	3.1	1 (4)	0.4
Мультиплеты	2 (5)	1.5	1 (4)	0.4

f, частота мутаций



Рисунок 27. Частоты различных типов основных мутаций, индуцированных УФ-светом в *him1Δ* (1-ЕАА-3031) (Pol η работает) и *him1Δ rad30Δ* (5-ЕАА-3031) (Pol η не работает) [90]

him1



him1 rad30

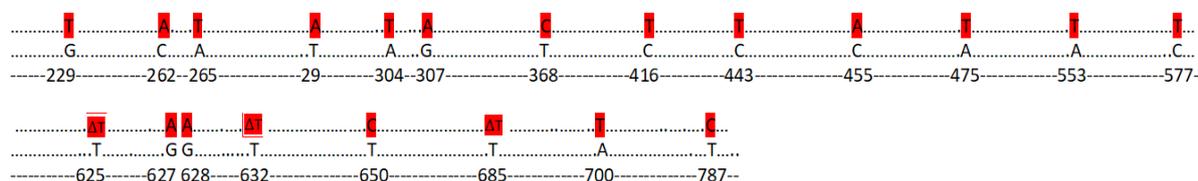


Рисунок 28. Мутации возникающие в локусе устойчивости к канаванину при облучении УФ-светом штаммов *him1Δ* (1-ЕАА-3031) (Pol η работает) и *him1Δ rad30Δ* (5-ЕАА-3031) (Pol η не работает)

Генетический анализ молекулярной природы мутантов *ade2* показал, что мутация *him1-1* специфически увеличивает частоту УФ-индуцированных переходов (АТ → GC и GC → АТ) по сравнению со штаммами дикого типа [4]. Мы сравнили типы изменений оснований, индуцированных УФ-светом, у штаммов *him1Δ* и *him1Δ rad30Δ* (Таблица 3).

Таблица 3. Типы замен оснований, индуцированных УФ-светом [90]

	<i>him1Δ</i>		<i>him1Δ rad30Δ</i>	
	n (%)	f × 10 ⁻⁵	n (%)	f × 10 ⁻⁵
Транзиции				
АТ→GC	6(21)	5.6	3(19)	1.3
GC→АТ	13(46)	11.5	3(19)	1.3
Трансверсии	9(33)	8	10(62)	4
GC→ТА	1	0.8	1	0.4
АТ→ТА	6	5.6	5	2
ТА→АТ	1	0.8	2	0.8
ТА→GC			1	0.4
CG→АТ	1	0.8	1	0.4
Всего	28	-	16	-

Сравнение типов изменений оснований, наблюдаемых у штаммов *him1Δ* и *him1Δ rad30Δ*, обнаруживает существенные различия. Частота переходов была достоверно снижена в штамме *him1Δ rad30Δ* по сравнению со штаммом *him1Δ*. Частота УФ-индуцированных мутаций, локализованных в сайтах NBP (небипиримидиновые сайты), также значительно различалась между *him1Δ* (21×10^{-5}) и *him1Δ rad30Δ* ($1,3 \times 10^{-5}$) (Рисунок 29). В совокупности полученные данные показывают значительную роль Polη в *him1*-зависимом УФ-индуцированном мутагенезе, особенно в сайтах NBP [90].

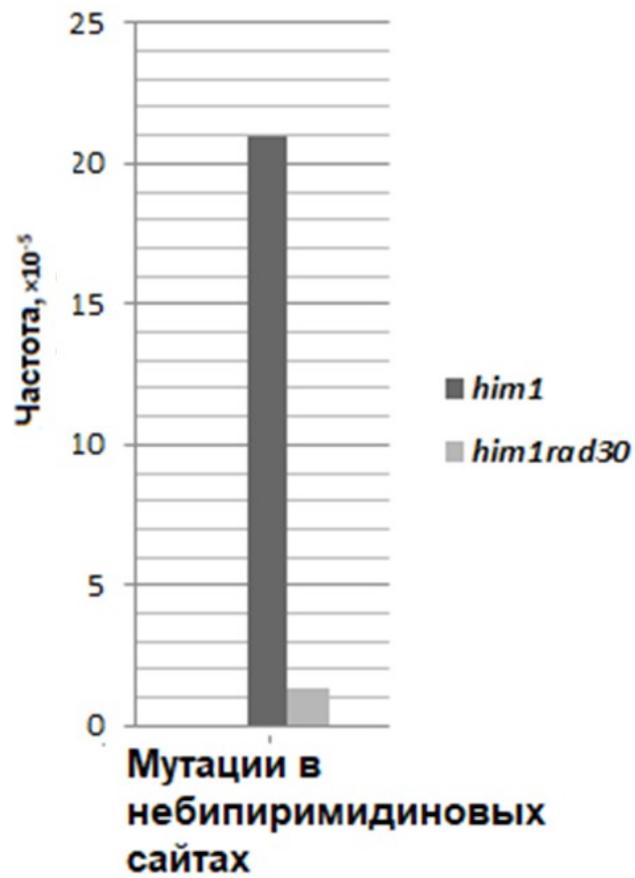


Рисунок 29. Частота мутаций в небипиримидиновых сайтах у штаммов *him1Δ* (1-ЕАА-3031) и *him1Δ rad30Δ* (5-ЕАА-3031) [90]

3.4. Взаимодействие гена *HIM1* с генами, контролирующими различные этапы чекпойнта

В разделе обзор литературы была показана связь процессов ГРР, ПРР и чекпойнта. Поэтому мы решили проверить взаимодействие мутации *him1Δ* с *rad53-НА-F* (*him1Δ rad53-C*), *pph3* и *psy4*, кодирующих ключевую киназу чекпойнта Rad53 и две субъединицы фосфатазного комплекса РРНЗ, соответственно.

3.4.1. Взаимодействие мутации *him1Δ* с мутацией в гене *RAD53*, затрагивающей С-концевой домен киназы Rad53

Киназа Rad53, является одной из основных киназ, контролирующих чекпойнт [22]. Активный Rad53 индуцирует значительное увеличение концентрации дНТФ для обеспечения репаративного синтеза пострепликативных брешей ДНК.

Известно, что фосфатаза Pph3 предпочтительно дефосфорилирует С-концевые участки белка Rad53. Мы предположили, что нарушение структуры С-концевого участка белка может приводить к нарушению некоторых функций Rad53. Чтобы проверить это предположение, мы изменили С-концевую последовательность белка Rad53, добавив в рамку считывания последовательность НА-F (гемагглютинин эпитопа вируса гриппа). Этот мутант был протестирован на устойчивость к УФ-облучению и УФ-индуцированному мутагенезу (Рисунок 30). Как видно из Рисунка 34, данный мутант не отличался от штамма дикого типа ни по устойчивости к УФ, ни по УФ-индуцированному мутагенезу. Далее был создан двойной мутант *him1Δ rad53-НА-F* и изучено влияние аллеля гена *RAD53* на выживаемость и мутагенез двойного мутанта при УФ-облучении.

Как видно из Рисунка 30 мутация гена *RAD53* эпистатировала к мутации

him1Δ, снижая уровень УФ-индуцированного мутагенеза до уровня штамма дикого типа, который идентичен уровню одиночного мутанта *rad53-HA-F*. Таким образом, мутация в С-концевом домене гена *RAD53* подавляет *him1*-зависимый мутагенез.

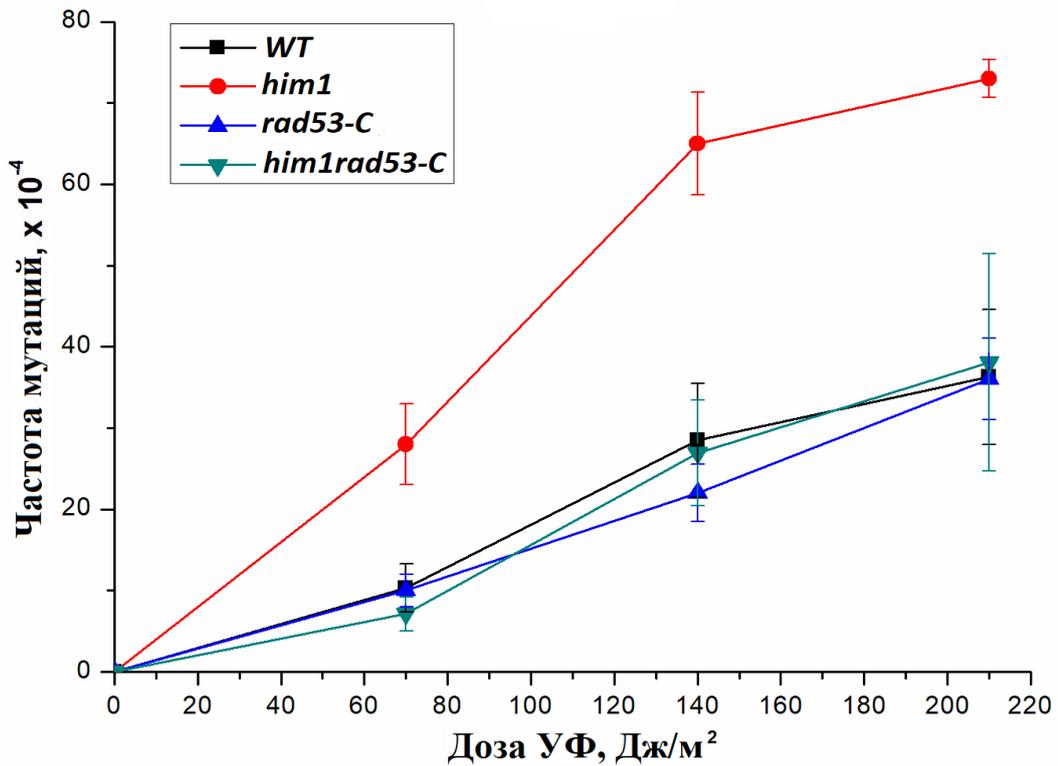


Рисунок 30. УФ-индуцированный мутагенез в локусах *ADE4-ADE8* у штамма дикого типа (11D-3031) и мутантных штаммов *him1Δ* (1-EAA-3031), *rad53-C* (*rad53-HA-F*) (10-DVF-3031), *him1Δ rad53-C* (*him1 Δrad53-HA-F*) (9-DVF-3031). На графике нанесены средние значения \pm SEM, полученные в 4 независимых экспериментах

3.4.2. Взаимодействие мутации *him1Δ* с мутациями *pph3Δ* и *psy4Δ*

Было показано, что некоторые фосфатазы специфически продуцируют различные формы модификаций Rad53, которые необходимы для адекватного ответа на определенные повреждения ДНК [98]. Активность киназы Rad53 в клетке, в том числе, контролируется фосфотазным комплексом PPH3, который состоит из трех субъединиц Pph3-Psy2-Psy4. Данный комплекс участвует в контроле чекпойнта и ПРР [15].

Как можно видеть из рисунка 31, у мутантов *pph3Δ him1Δ* и *psy4Δ him1Δ* наблюдается снижение *him1*-зависимого УФ-индуцированного мутагенеза, ниже уровня дикого типа. Из этих результатов следует, что увеличение активности киназы Rad53 полностью подавляет *him1*-зависимый УФ-индуцированный мутагенез.

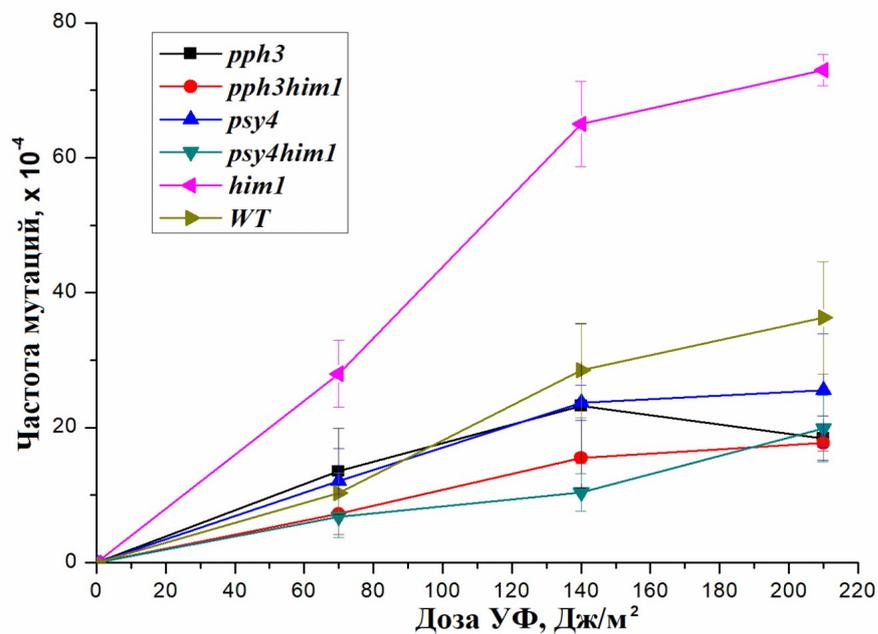


Рисунок 31. УФ-индуцированный мутагенез в локусах *ADE4-ADE8* у штамма дикого типа (11D-3031) и мутантных штаммов *him1Δ* (1-EAA-3031),

pph3Δ (9-DVF-3031), *psy4Δ* (10-DVF-3031), *pph3Δ him1Δ* (11-EAA-3031) и *psy4Δ him1Δ* (12-EAA-3031). На графике нанесены средние значения \pm SEM, полученные в 4 независимых экспериментах

Инактивация комплекса РРНЗ приводит к конституционному повышению активности киназы Rad53, что может быть причиной повышения уровня дНТФ в клетках мутантов. Последнее может оказывать влияние на мутационный процесс. Для проверки этого предположения мы провели сравнение экспрессии гена *RNR3* в клетках дикого типа и мутанте *pph3Δ*. Результаты, приведенные на рисунке 32 показывают, что инактивация гена, кодирующего каталитическую субъединицу фосфатазного комплекса РРНЗ, приводит к увеличению экспрессии гена *RNR3* в клетке.

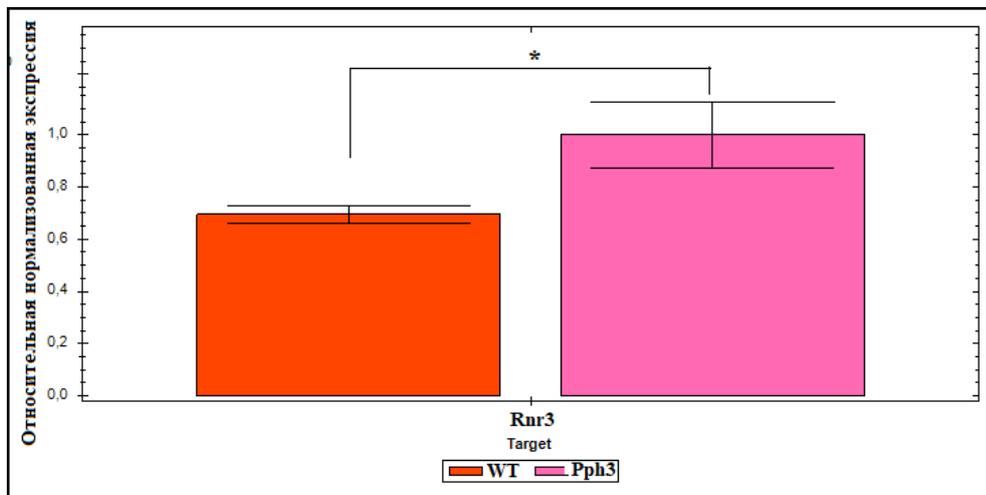


Рисунок 32. Уровень экспрессии гена *RNR3* у штамма дикого типа (11D-3031) и мутантного штамма *pph3Δ* (9-DVF-3031). * $p < 0.05$, t-тест Стьюдента

3.5. Влияние уровня дНТФ на *him1*-зависимый УФ-индуцированный мутагенез

Для дальнейшего выяснения связи уровня дНТФ с *him1*-зависимым УФ-индуцированным мутагенезом мы изучили взаимодействие мутации *him1Δ* с мутациями в генах *SML1* и *DUN1*, контролирующих синтез дНТФ в клетках дрожжей.

3.5.1. Взаимодействие мутации *sml1Δ* с мутацией *him1Δ*

Ген *SML1*, кодирует белок Sml1, функция которого заключается в ингибировании рибонуклеотид редуктазного комплекса RNR через ингибирование его каталитической субъединицы Rnr1 [99, 100].

При совмещении мутации *sml1Δ*, которая приводит к кратному увеличению концентрации дНТФ в клетке, с мутацией *him1Δ* у двойного мутанта *sml1Δ him1Δ* наблюдается снижение *him1*-зависимого УФ-индуцированного мутагенеза по сравнению с одиночной мутацией *him1Δ*. Частота УФ-индуцированного мутагенеза у одиночного мутанта *sml1Δ* практически не отличается от таковой у двойного мутанта *sml1Δ him1Δ*, и у обоих мутантных штаммов частота индуцированного мутагенеза значительно ниже по сравнению со штаммом дикого типа (Рисунок 33). То есть, высокие концентрации дНТФ в клетке способствуют снижению частоты *him1*-зависимого УФ-индуцированного мутагенеза [90].

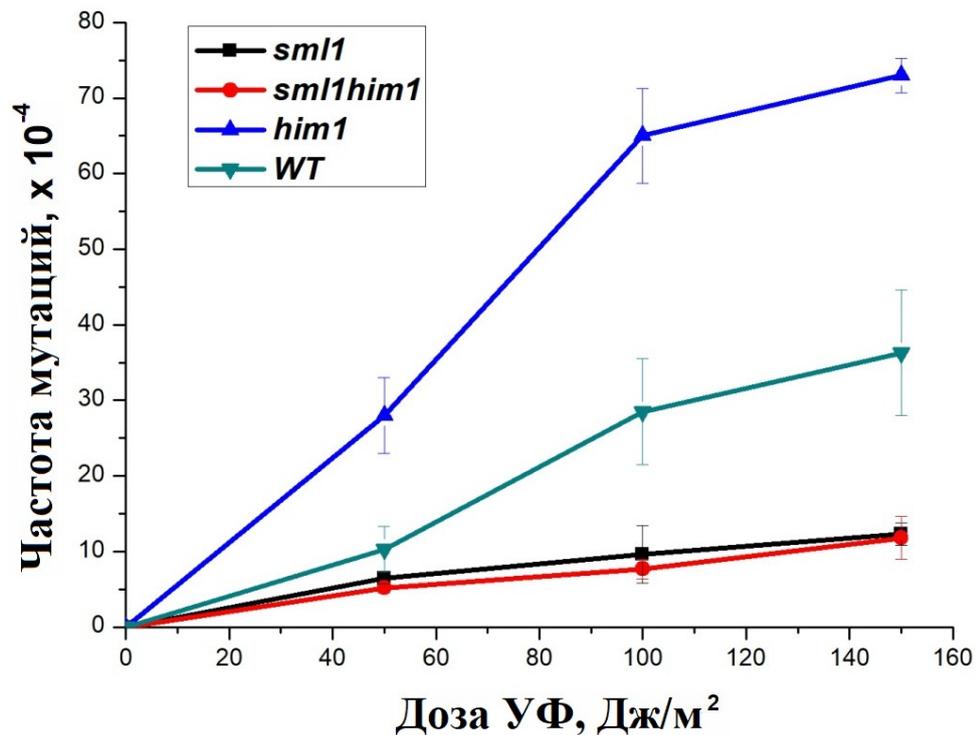


Рисунок 33. УФ-индуцированный мутагенез в локусах *ADE4-ADE8* у штамма дикого типа (11D-3031) и мутантных штаммов *him1Δ* (1-EAA-3031), *sml1Δ* (6-DVF-3031) и *sml1Δ him1Δ* (7- DVF-3031). На графике нанесены средние значения \pm SEM, полученные в 4 независимых экспериментах [90]

3.5.2. Взаимодействие мутации *dun1Δ* с мутацией *him1Δ*

Ген *DUN1* кодирует киназу Dun1, которая регулирует уровень дНТФ путем активации транскрипции ряда субъединиц рибонуклеотид редуктазного комплекса RNR и инактивации белка Sml1 [101, 102].

При совмещении мутации *him1Δ* с мутацией *dun1Δ*, у двойного мутанта *dun1Δ him1Δ* наблюдали снижение частоты *him1*-зависимого УФ-индуцированного мутагенеза по сравнению с одиночной мутацией *him1Δ*, приблизительно до уровня дикого типа. При этом наблюдалось слабое снижение частоты УФ-индуцированного мутагенеза у одиночного мутанта *dun1Δ*, по сравнению со штаммом дикого типа (Рисунок 34). Из этих данных следует, что

резкое понижение уровня дНТФ, также как, и его повышение, приводит к блокированию *him1*-зависимого УФ-индуцированного мутагенеза.

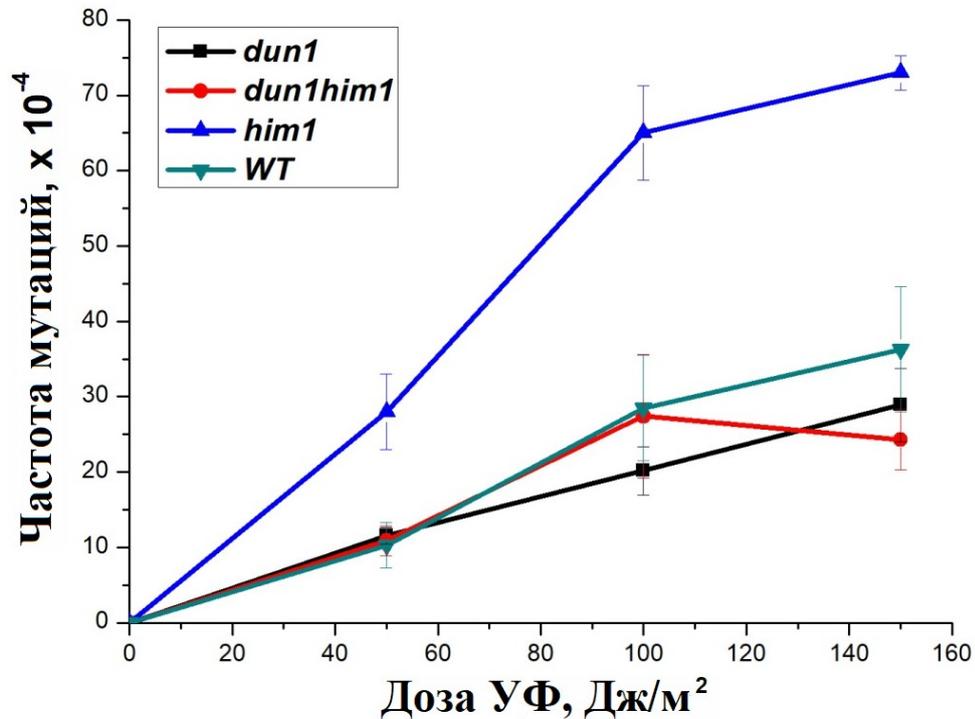


Рисунок 34. УФ-индуцированный мутагенез в локусах *ADE4-ADE8* у штамма дикого типа (11D-3031) и мутантных штаммов *him1Δ* (1-EAA-3031), *dun1Δ* (8-DVF-3031) и *dun1Δ him1Δ* (2-EAA-3031). На графике нанесены средние значения \pm SEM, полученные в 4 независимых экспериментах [90]

3.5.3. Изучение экспрессии гена *RNR3* в штамме с делецией гена *HIM1*

Полученные выше данные свидетельствуют о наличии связи *him1*-зависимого УФ-индуцированного мутагенеза с уровнем дНТФ в клетке. Для доказательства, участия гена *HIM1*, в контроле пула дНТФ, мы использовали метод полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР в реальном времени) для измерения экспрессии гена *RNR3*, продукт которого, является второй каталитической субъединицей комплекса RNR. Известно, что при нормальных условиях роста у штаммов дикого типа ген *RNR3*, практически не

экспрессируется, однако его экспрессия резко увеличивается в ответ на повреждение ДНК [102, 103].

Мы измерили уровень экспрессии *RNR3* у штамма дикого типа и мутантного штамма *him1Δ*, без облучения УФ-светом, и после облучения при дозах УФ-света 256 Дж/м² и 140 Дж/м², результаты представлены на рисунке 35. Как видно из рисунка, в экспериментах без УФ-облучения уровень экспрессии *RNR3* в мутанте *him1Δ* примерно в два раза ниже, чем в клетках дикого типа. При УФ-облучении разница в уровнях экспрессии *RNR3* увеличивается почти на порядок. Уменьшение дозы УФ-облучения, практически, не повлияло на экспрессию гена *RNR3* в изучаемых штаммах [90].

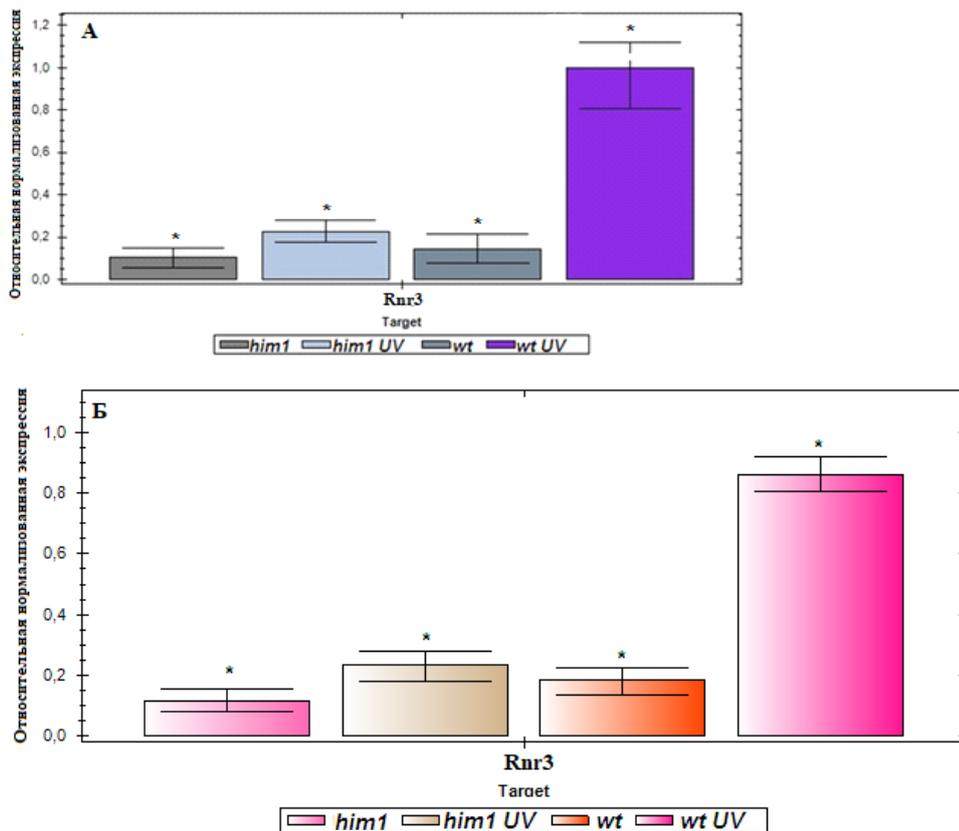


Рисунок 35. Экспрессия гена *RNR3* в штаммах ДТ (11D-3031) и мутанта *him1Δ* (1-ЕАА-3031) до и после облучения УФ-светом. Доза УФ-света А) 256 Дж/м² и Б) 140 Дж/м². * $p < 0.05$, t-тест Стьюдента [90]

Суммируя полученные данные, можно сделать заключение, что мутация *him1Δ* подавляет экспрессию гена *RNR3* как в норме, так и особенно после УФ-облучения.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ

Целью проведенного исследования было изучение роли гена *HIM1* в регуляции мутационного процесса у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Первичная последовательность ДНК этого гена имеет гомологию только в клетках близкородственных видов дрожжей. Функция белка Him1p неизвестна и в *Saccharomyces genome database* нет информации о физическом взаимодействии этого белка с другими дрожжевыми белками.

4.1. Роль гена *HIM1* в регуляции мутационного процесса

Реакцией на повреждение ДНК может быть как активация систем репарации повреждений ДНК, так и запуск механизма остановки клеточного цикла. Чтобы реакция на повреждение ДНК работала на благо клетки, важно, чтобы ответы на повреждение ДНК правильно регулировались. Предыдущие эксперименты показали, что мутация *him1-1* демонстрирует мутаторный фенотип, пятикратно увеличивая уровень спонтанных реверсий *ade2-42*, значительно увеличивала уровень УФ-индуцированного мутагенеза. На основании полученных данных мы предположили, что ген *HIM1* участвует в контроле процессинга повреждений ДНК, возникающих после УФ-облучения. Результаты более ранних работ [3,7] позволили сделать предположение, что продукт гена *HIM1* принимает участие в пострепликативной репарации (ПРР) и гомологичной рекомбинационной репарации (ГРР). На основании этих данных мы сделали предположение, что белок Him1 играет роль в рекомбинационной (безошибочной) ветви ПРР. Начальные этапы этого пути контролируются генами *MMS2* и *XRS2*. В связи с этим, мы провели эпистатический анализ взаимодействия мутации *him1Δ* с мутациями *mms2Δ* и *xrs2Δ*. Данные, представленные на рисунках 21 и 22, по мутанту *mms2Δ*, и по мутанту *xrs2Δ*, показывают, что *him1*-зависимый УФ-индуцированный мутагенез полностью зависит от нормального

функционирования генов *MMS2* и *XRS2*, которые кодируют субъединицы белковых комплексов осуществляющих полиубиквитинирование PCNA и деградацию вновь синтезированной ДНК. Суммируя ранее полученные данные и результаты, приведенные выше, можно сделать вывод, что ген *HIM1* является новым участником в контроле безошибочной ветви ПРР. При этом его участие относится к этапам ПРР, следующим после завершения функции иницилирующих комплексов.

На каком этапе процесса ПРР принимает участие *HIM1*? В результате деградации вновь синтезированной ДНК, осуществляемой комплексом MRX (*Mre11/Rad50/Xrs2*), происходит расширение однонитевой бреши ДНК и освобождение 3'-конца от репликативного комплекса. Далее 3'-конец откручивается от комплементарной нити с помощью, предположительно, геликазы *Pif1* и иницирует рекомбинационный процесс с сестринской хроматидой. На первом этапе этого процесса образуется D-петля. Здесь мы показали, что инактивация двух антирекомбинационных геликаз *Srs2* и *Mph1*, которые разрушают D-петли, подавляет *him1*-зависимый мутагенез [93].

Обе эти геликазы дестабилизируют D-петли и уменьшают среднюю длину синтезируемого участка ДНК [104-108]. Следовательно, их инактивация будет приводить к увеличению длины вновь синтезируемой ДНК, что и является причиной подавления *him1*-специфического мутагенеза. С другой стороны, делеция гена *HSM2* (*HMO1*), продукт которого стабилизирует D-петли, приводит к фенотипу, сходному с мутацией *him1Δ* [7, 5, 109, 110]. На основании полученных данных мы сделали заключение, что мутация *him1Δ* приводит к укороченному синтезу ДНК в D-петле.

Длина вновь синтезированного участка ДНК в D-петле регулируется эндонуклеазным комплексом *Mus81-Mms4*. Этот структурно-специфичный эндонуклеазный комплекс активируется в поздней S-фазе и требуется для разрешения промежуточных продуктов рекомбинации (двойная структура Холидея и др.), возникающих в процессе репарации поврежденной ДНК [94, 95].

В клетках дикого типа средняя длина синтезированной ДНК, как правило, превышает среднюю длину застраиваемой брешы. При инактивации субъединицы *Mms4* длина вновь синтезированной ДНК резко возрастает и это приводит к исчезновению *him1*-зависимого УФ-индуцированного мутагенеза в двойном мутанте *him1Δ mms4Δ* (Рисунок 25).

В работе Келберг с коллегами [3] показано, что мутации *him1Δ* и *pms1Δ* обладают синергетическим эффектом на УФ-индуцированный мутагенез. Уровень индуцированного мутагенеза у двойного мутанта *him1Δ pms1Δ* был достоверно выше, чем у обоих одиночных мутантов. С другой стороны, одиночный мутант *pms1Δ* и штамм дикого типа имеют одинаковый уровень УФ-индуцированных мутаций. Это неудивительно, так как неправильный нуклеотид напротив УФ-индуцированного повреждения (пиримидиновые димеры), не является субстратом для мисматч репарации. Поскольку мисматч репарационный ген *PMS1* не имеет прямого отношения к мутагенезу, индуцированному повреждением, мы предположили, что субстраты мисматч репарации возникли в клетках мутанта *him1Δ* в результате привлечения полимеразы η (*Pol η*) (данную полимеразу кодирует ген *RAD30*) к синтезу ДНК в брешы. В соответствии с этим предположением мы обнаружили, что инактивация *Pol η* (мутация *rad30Δ*) полностью блокирует *him1*-зависимый УФ-индуцированный мутагенез (Рисунок 26).

Для подтверждения полученного результата мы провели эксперименты по изучению спектра УФ-индуцированных мутаций в штаммах *him1Δ* и *him1Δ rad30Δ*. Результаты этих экспериментов показывают большие различия в спектрах мутаций у этих мутантов. В первую очередь, обращает на себя внимание резкое увеличение среди замен пар оснований транзиций в спектре одиночного мутанта *him1Δ*, по сравнению с двойным мутантом, 67% и 38%, соответственно.

С другой стороны, наши данные показали, что *Pol η* -зависимый мутагенез в сайтах NBP (небипиримидиновые сайты) встречается значительно чаще у мутанта *him1Δ*, чем у двойного мутанта *him1Δ rad30Δ*. Этот результат свидетельствует о

том, что во время ПРР Pol η эффективно работает на неповрежденной матрице.

Таким образом, проанализировав полученные выше результаты мы пришли к заключению, что *him1*-зависимый УФ-индуцированный мутагенез является следствием преждевременного прекращения репаративного синтеза ДНК в D-петле. Это приводит к тому, что вновь синтезированный участок ДНК не перекрывает всей брешы и оставшаяся ее часть заполняется часто ошибающейся Pol η . Почему это происходит? Дело в том, что Pol η в отличие от Pol δ не обладает нитевытесняющей способностью, из-за этого она не может работать в D-петле. А после разрушения D-петли вероятность того, что в оставшейся брешы будет работать Pol η возрастает в поздней S-фазе, где концентрация данной полимеразы высокая и тем самым у Pol η больше шансов провести синтез на образовавшейся брешы. Какова причина преждевременной терминации репаративного синтеза ДНК в D-петле? Терминация синтеза ДНК в D-петле, как сказано выше, осуществляется эндонуклеазным комплексом Mus81-Mms4. Скорость эндонуклеазной реакции зависит от концентрации субстрата (количество D-петель) и концентрации эндонуклеазы Mus81-Mms4. Оба эти параметра при одинаковых условиях облучения клеток дикого типа и мутанта *him1 Δ* , по-видимому, одинаковы. Следовательно, причиной сокращения длины синтезированного участка может быть снижение скорости синтеза ДНК в клетках мутанта *him1 Δ* по сравнению с клетками дикого типа.

Известно, что скорость синтеза ДНК зависит от концентрации дНТФ, которая зависит от активности киназы Rad53. Отсюда мы сделали предположение, что мутация *him1 Δ* приводит к снижению концентрации дНТФ в клетках мутанта *him1 Δ* , что автоматически снижает скорость репаративного синтеза ДНК в его клетках.

Для выяснения связи уровня дНТФ с *him1*-зависимым УФ-индуцированным мутагенезом мы провели эксперименты с генами, кодирующими субъединицы рибинуклеотидредуктазного комплекса RNR. Белок Sml1 выполняет регуляторную функцию, являясь супрессором каталитической субъединицы

комплекса RNR. В течение чекпойнтной активации этот белок фосфорилируется киназой Dun1 и направляется в протеосому для деградации. Наши эксперименты с двойным мутантом *sml1Δ him1Δ* показали, что резкое увеличение концентрации дНТФ в клетках полностью блокирует *him1*-зависимый УФ-индуцированный мутагенез (Рисунок 33).

Примерно такой же результат мы получили в экспериментах с мутантом по гену *DUN1* (Рисунок 34), продукт которого при активации повышает экспрессию ряда генов, кодирующих субъединицы комплекса RNR, и инактивирует супрессорный эффект белка Sml1. Таким образом, как кратное повышение, так и резкое снижение уровня дНТФ в клетках полностью подавляет *him1*-зависимый УФ-индуцированный мутагенез.

Какой уровень дНТФ отвечает за повышенный УФ-индуцированный мутагенез в клетках дрожжей? Для ответа на этот вопрос мы провели эксперименты по измерению экспрессии гена *RNR3* при помощи полимеразной цепной реакции в реальном времени. Как можно видеть из рисунка 35, уровень экспрессии *RNR3* в клетках мутанта *him1Δ* без облучения немного ниже по сравнению с клетками дикого типа. После облучения этот уровень повышается примерно в два раза, в то время как в клетках дикого типа происходило 5-кратное увеличение экспрессии *RNR3*.

На основании полученных данных можно сделать заключение, что уменьшение уровня дНТФ во время репаративного синтеза ДНК в D-петле существенно снижает скорость синтеза, что является причиной укорочения вновь синтезированных участков ДНК и приводит к *him1*-зависимому УФ-индуцированному мутагенезу.

Мы можем представить роль гена *HIM1* в регуляции мутационного процесса у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, в виде схемы, изображенной на рисунке 36 [90].

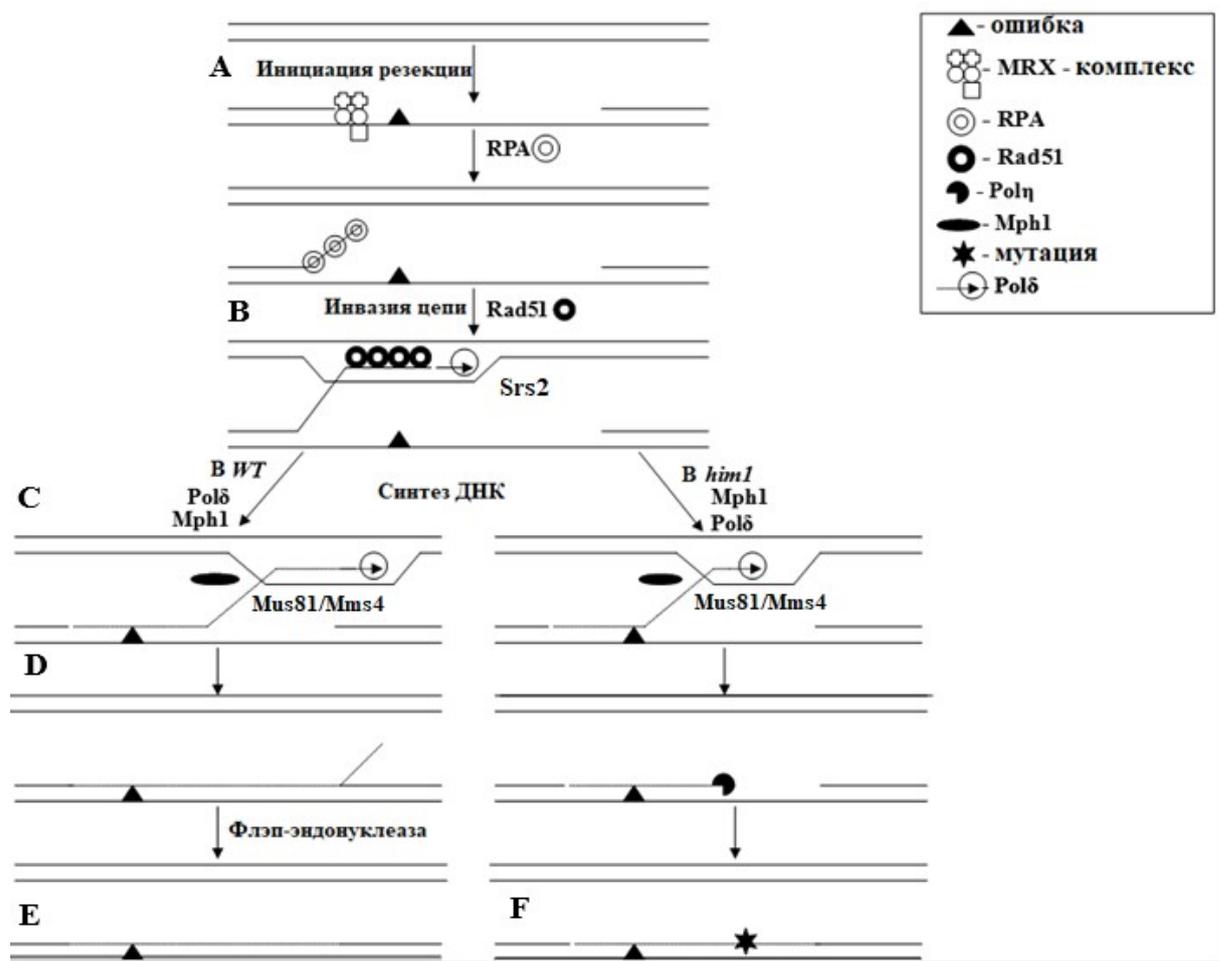


Рисунок 36. Роль гена *HIM1* в регуляции мутационного процесса у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Остановленный репликативный комплекс распознается комплексом Mre11-Rad50-Xrs2 (MRX). MRX -комплекс инициирует резекцию вновь синтезированной цепи ДНК (А). Далее происходит высвобождение 3'-конца онДНК, предположительно геликазой Pif1 и свободная онДНК связывается с RPA (А). После замены RPA на Rad51 образуется филамент онДНК-Rad51, который вводится в сестринскую хроматиду, что приводит к образованию D-петли (В). Далее Polδ начинает синтез ДНК в D-петле (С). В штамме ДТ, Polδ продолжает синтез ДНК, до тех пор, пока вновь синтезированная нить ДНК полностью не перекроет брешь, после чего D-петля разрешается при помощи структурно специфичной эндонуклеазы Mus81-Mms4 и геликазы Mph1 (D). В результате чего происходит безошибочный обход повреждения ДНК (E). В мутанте *him1Δ* синтез ДНК в D-петле, начинает также Polδ (С). Однако в

результате работы той же структурно специфичной нуклеазы Mus81-Mms4 из-за снижения скорости синтеза происходит преждевременное разрушение D-петли, что приводит к замене Pol δ на TLS ДНК-Pol η (F), Pol η , продолжает синтез до первой ошибки, после чего, по всей видимости, ее заменяет Pol ζ , которая и завершает застройку бреши

ВЫВОДЫ

1) Изучение свойств двойных мутантов *him1Δ mms2Δ* и *him1Δ xrs2Δ*, показало, что продукт гена *HIM1* принимает участие в контроле безошибочной ветви пострепликативной репарации у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*;

2) Изучение свойств двойных мутантов *him1Δ mph1Δ*, *him1Δ srs2Δ* и *him1Δ mms4Δ*, показало, что продукт гена *HIM1* принимает участие в стабилизации D-петли, путем регуляции скорости синтеза ДНК;

3) Мутация *him1Δ* приводит к снижению экспрессии гена *RNR3*, продукт которого входит в состав рибонуклеотид редуктазного комплекса RNR, ответственного за синтез, дезоксинуклеотидтрифосфатов;

4) Повышенный УФ-индуцированный мутагенез в мутанте *him1Δ* обусловлен заменой в процессе репаративного синтеза ДНК репликативной ДНК-полимеразы δ на TLS ДНК-полимеразу η .

СПИСОК ПРИНЯТЫХ СОКРАЩЕНИЙ

- BIR (Break-Induced Replication) — репликация, вызванная разрывом ДНК
- CPD (Cyclobutane Pyrimidine Dimer) — циклобутановые пимиридиновые димеры
- DDR (DNA Damage Response) — ответ на повреждение ДНК
- dCMP/дЦМФ — дезоксицитидинмонофосфат
- dNTP/дНТФ — дезоксинуклеотидтрифосфаты
- HAT — гистонацетилтрансфераза
- HDAC — гистондеацетилаза
- HU/ГМ — гидроксимочевина
- NHEJ (Non-Homologous End Joining) — негомологичное соединение концов (“незаконная” рекомбинация)
- MMR (MisMatch Repair) — мисматч репарация (коррекция ошибочно спаренных оснований)
- PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) — ядерный антиген пролифелирующих клеток
- 6-4 PP (PhotoProduct) — 6-4 фотопродукты
- RNR (RiboNucleotid Reducase) — рибонуклеотид редуктаза
- RPA (Replication Protein A) — репликативный белок А
- ±SEM — стандартная ошибка среднего
- SDSA (Synthesis-Dependent Strand Annealing) — синтез-зависимый отжиг нити
- SSA (Single-Strand Annealing) — однострессовой отжиг
- TLS (TransLesion Synthesis) — синтез через повреждения
- TS (Template Switching) — переключение матриц
- WT/ДТ — дикий тип
- ГРР — гомологичная рекомбинационная репарация
- днДНК — двунитевая ДНК
- ДНР — двунитевой разрыв ДНК
- ММС — метилметансульфонат

онДНК — однонитевая ДНК

ОНР — однонитевой разрыв ДНК

ПРР — пострепликативная репарация

ПТМ – посттрансляционные модификации

ПЦР — полимеразная цепная реакция

ПЦР РВ — полимеразная цепная реакция в реальном времени

ТПД — толерантность к повреждению ДНК

УФ — ультрафиолетовое излучение

ЭРН — эксцизионная репарация нуклеотидов

ЭРО — эксцизионная репарация оснований

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Иванов Е.Л. Выделение и характеристика новых мутантов дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* с повышенной спонтанной мутабельностью / Иванов Е.Л., Федорова И.В., Ковальцова С.В. // Генетика, 1992. -Т. -28. -№5. -С. 47-55
2. Федорова И.В. Влияние мутаций *hsm*, повышающих спонтанную мутабельность, на индуцированный мутагенез и митотическую рекомбинацию у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* / Федорова И.В., Ковальцова С.В., Иванов Е.Л // Генетика, 1992. -Т. 28. -№7. -С. 54-65
3. Kelberg E.P. *HIM1*, a new yeast *Saccharomyces cerevisiae* gene playing a role in control of spontaneous and induced mutagenesis / Kelberg E.P., Kovaltsova S.V., Alekseev S.Y. [et al] // Mutat. Res., 2005. -V.578. -P.64-78. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2005.03.003
4. Ivanov E.L. Mutants of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* characterized by enhanced induced mutagenesis. III. Effect of the *him* mutation on the effectiveness and specificity of UV-induced mutagenesis / Ivanov E.L., Koval'tsova S.V., Korolev V.G. // Genetika, 1987. -V.23. -№9. -P.1555-1563
5. Alekseev S.Yu. *HSM2 (HMO1)* gene participates in mutagenesis control in yeast *Saccharomyces cerevisiae* / Alekseev S.Yu., Kovaltsova S. V., Fedorova I. V., [et al] // DNA Repair, 2002. -V.1. -№4. -P.287-297. doi: 10.1016/s1568-7864(02)00005-8
6. Ковальцова С.В. Гены мутаторы дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Взаимодействие *him* и *hsm* с мутациями, блокирующими три основные пути репарации индуцированных повреждений ДНК / Ковальцова С.В., Грачева Л.М, Евстюхина Т.А., [и др] // Генетика, 1996. -Т. 32. -№7. -С. 922-926
7. Ivanov E.L. *Saccharomyces cerevisiae* mutants with enhanced induced mutation and altered mitotic gene conversion / Ivanov E.L., Kovaltsova S.V., Korolev V.G. // Mutat. Res., 1989. -V.213. -№2. -P.105–115. doi: 10.1016/0027-5107(89)90141-3
8. Inbar O. The relationship between homology length and crossing over during

the repair of a broken chromosome / Inbar O., Liefshitz B., Bitan G., [et al] // J. Biol. Chem., 2000. -V.275. -№40. -P.30833-30838. doi: 10.1074/jbc.C000133200

9. Gadai C. Hmo1, an HMG-box protein, belongs to the yeast ribosomal DNA transcription system / Gadai C., Labarre S., Djschiero C., [et al] // EMBO J., 2002. -V. 21. -№20. -P. 5498-5507

10. Ge Z. Nuclear Hat1p complex (NuB4) components participate in DNA repair-linked chromatin reassembly / Ge Z., H. Wang H., Parthun M.R // J. Biol. Chem., 2011. -V.286. -№19. -P.16790-16799. doi: 10.1074/jbc.M110.216846

11. Evstyukhina T.A. Genetic Analysis of the Hsm3 Protein Function in Yeast *Saccharomyces cerevisiae* NuB4 Complex / Evstyukhina T.A., Alekseeva E.A., Fedorov D.V., [et al] // Genes, 2021. -V.12. -№1083. doi: 10.3390/genes12071083

12. Le Tallec B. Hsm3/S5b participates in the assembly pathway of the 19S regulatory particle of the proteasome / Le Tallec B., Barrault M.-B., Guerois R., [et al] // Molec. Cell., 2009. -V. 33. -№3. -P. 389-399. doi: 10.1016/j.molcel.2009.01.010

13. Черненко А.Ю. Генетический анализ доменной структуры белка Hsm3 дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* / Черненко А.Ю., Иванова С.В., Ковальцова С.В., [и др] // Генетика, 2010. -Т. 46. -№6. -С. 742-749

14. Федоров Д.В. Ген *HSM6* идентичен гену *PSY4* дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* / Федоров Д.В., Ковальцова С.В., Евстюхина Т.А., [и др] // Генетика, 2013. -Т.49. -№3. -С.1-9. doi: 10.7868/s0016675813020069

15. Федоров Д.В. Фосфатаза РРН3 вовлечена в регуляцию безошибочной ветви пострепликативной репарации в дрожжах *Saccharomyces cerevisiae* / Федоров Д.В., Евстюхина Т.А., Пешехонов В.Т., [и др] // Генетика, 2021. -Т.57. -№2. -С.155-165. doi: 10.31857/S0016675821010069

16. Ngo G.H.P. The 9-1-1 checkpoint clamp coordinates resection at DNA double strand breaks / Ngo G.H.P., Lyball D. // Nucleic Acids Res., 2015. -V.43. -№10. -P. 5017-5032. doi: 10.1093/nar/gkv409

17. Bantele B.C.S. Quantitative sensing and signalling of single-stranded DNA during the DNA damage response / Bantele B.C.S., Lisby M., Pfander B // Nat

Commun., 2019. -V.43. -№10. -P.944. doi: 10.1038/s41467-019-08889-5

18. Hauer M.H. Chromatin and nucleosome dynamics in DNA damage and repair / Hauer M.H., Gasser S.M. // *Genes & Development*, 2017. -V.31. -№22. -P.2204–2221. doi:10.1101/gad.307702

19. Puddi F. Sensing of replication stress and Mec1 activation act through two independent pathways involving the 9-1-1 complex and DNA polymerase ϵ / Puddi F., Piergiovanni G., Plevani P., [et al] // *PLoS Genet.*, 2011. -V.7. -№3. -P.e1002022. doi: 10.1371/journal.pgen.1002022

20. Majka J. The checkpoint clamp activates Mec1 kinase during initiation of the DNA damage checkpoint / Majka J., Niedziela-Majka A., Burgers P.M.G // *Mol Cell.*, 2006. -V.24. -№6. -P.891-901. doi: 10.1016/j.molcel.2006.11.027

21. Puddu F. Phosphorylation of the Budding Yeast 9-1-1 Complex Is Required for Dpb11 Function in the Full Activation of the UV-Induced DNA Damage Checkpoint / Puddu F., Granata M., Di Nola L., [et al] // *Mol. Cell. Biol.*, 2008. -V.28. -№15. -P.4782-93. doi: 10.1128/MCB.00330-08

22. Pardo B. Signaling pathways of replication stressing yeast / Pardo B., Crabbe L., Pasero P // *FEMS Yeast Res.*, 2017. -V.17. -№2. doi: 10.1093/femsyr/fow101

23. Yi C. DNA Repair by Reversal of DNA Damage / Yi C., He C. // *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2013. -V.5. -№ a012575. doi: 10.1101/cshperspect.a012575

24. Suter B. Chromatin structure modulates DNA repair by photolyase in vivo / Suter B., Livingstone-Zatchej M., Thoma F. // *J. The EMBO*, 1997. -V.16. -№8. -P.2150–2160. doi: 10.1093/emboj/16.8.2150

25. Kelner A. Effect of visible light on the recovery of streptomyces griseus conidia from ultraviolet irradiation injury / Kelner A. // *The Biol. Lab.* 1949. -V. 35. -№2. -P.73-79. doi: 10.1073/pnas.35.2.73

26. Wang D-Y. Photoprotective Role of Photolyase-Interacting *RAD23* and Its Pleiotropic Effect on the Insect-Pathogenic Fungus *Beauveria bassiana* / Wang D-Y., Mou Y.-N., Tong S-M., [et al] // *Appl. Environ. Microbiol.*, 2020. -V.86. -№11. -P.e00287-20. doi: 10.1128/AEM.00287-20

27. Sancar G.B. Interactions between Yeast Photolyase and Nucleotide ExcisionRepair Proteins in *Saccharomyces cerevisiae* and *Escherichia coli* / Sancar G.B., Smith F.W. // Mol. Cell Biol., 1989. -V.9. -№11. -P.4767-76. doi: 10.1128/mcb.9.11.4767-4776.1989
28. Boiteux S. DNA Repair Mechanisms and the Bypass of DNA Damage in *Saccharomyces cerevisiae* / Boiteux S., Jinks-Robertson S. // Genetics, 2013. -V.193. -№4. -P.1025-64. doi: 10.1534/genetics.112.145219
29. Wanga D. A panorama of transcription-coupled repair in yeast chromatin / Wanga D. // PNAS., 2020. -V.117. -№35. -P.20991–20993. doi: 10.1073/pnas.2003868117
30. Mao P. Emerging roles for histone modifications in DNA excision repair / Mao P., Wyrick J. J. // FEMS Yeast Res., 2016. -V.16. -№7. -P.fow090. doi: 10.1093/femsyr/fow090
31. Freidberg E.C. DNA repair and mutagenesis / Freidberg E.C., Walker G.C., Siede W., [et al] // ASM Press. Washington, 2006. -2nd ed
32. Hanawalt P.C. Transcription-coupled DNA repair: two decades of progress and surprises / Hanawalt P.C., Spivak G. // Nat Rev Mol Cell Bio., 2008. -V.9. -P.958–70. doi: 10.1038/nrm2549
33. Meas R. Nucleosomes Regulate Base Excision Repair in Chromatin / Meas R., Wyrick J.J., Smerdon M. J. // Rev. Mutat. Res., 2019. -V.780. -P.29-36. doi: 10.1016/j.mrrev.2017.10.002
34. Czaja W. Chromatin remodeling complex RSC promotes Base Excision Repair in chromatin of *Saccharomyces cerevisiae* / Czaja W., Mao P., Smerdon M. J. // DNA Repair (Amst)., 2014. -V.16. -P.35-43. doi: 10.1016/j.dnarep.2014.01.002
35. Blank A. DNA polymerase δ is required for base excision repair of DNA methylation damage in *Saccharomyces cerevisiae* / Blank A., Kim B., L. Loeb L.A. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 1994. -V.91. -№19. -P.9047-51. doi: 10.1073/pnas.91.19.9047
36. Alseth I. The *Saccharomyces cerevisiae* Homologues of Endonuclease III

from *Escherichia coli*, Ntg1 and Ntg2, Are Both Required for Efficient Repair of Spontaneous and Induced Oxidative DNA Damage in Yeast / Alseth I., Eide L., M. Pirovano M., [et al] // Mol. Cell Biol., 1999. -V.19. -№5. -P.3779-87. doi: 10.1128/MCB.19.5.3779

37. Friedberg E.C. DNA repair and mutagenesis / E.C. Friedberg, J.C. Walker, W. Siede // Washington: Amer. Soc. Microbiol. Press, 1995. - P. 698.

38. Cooper A.J. DNA repair and mutagenesis in *Saccharomyces cerevisiae* / In: Enzyme induction, mutagen activation and carcinogen testing in yeast // Ellis Horwood Ltd., Chichester, 1987. - Ed. By A. Wiseman. - P. 73-114

39. Kramer W. Cloning and nucleotide sequence of DNA mismatch repair gene *PSM1* from *Saccharomyces cerevisiae*: homology of *PSM1* to prokaryotic MytL and HexB / Kramer W., Kramer B, Williamson M.S., [et al.] // J. Bact., 1989. - V.171. - P. 5339-5346. doi: 10.1128/jb.171.10.5339-5346.1989

40. Reyes G.X. New insights into the mechanism of DNA mismatch repair / Reyes G.X., Schmidt T.T., Kolodner R.D., [et al] // Chromosoma. 2015. -V.124. -№4. - P.443–462. doi:10.1007/s00412-015-0514-0

41. Fishel R. Mismatch Repair / Fishel R. // JBC Papers in Press., 2015. -V.290. - №44. -P.26395-403. doi:10.1074/jbc.R115.660142. 30

42. Kramer B. Heteroduplex DNA correction in *Saccharomyces cerevisiae* is mismatch specific and requires functional PMS gene / Kramer B. Kramer W., Williamson M.S., [et al.]. // Mol. Cell. Biol., 1989. - V.9. - P. 4432-4440. doi: 10.1128/mcb.9.10.4432-4440.1989

43. Schaaper R.M. Base selection, proofreading, and mismatch repair during DNA replication in *Escherichia coli* / R.M. Schaaper // J. Biol. Chem., 1993. - V. 268. - P. 23762-23765

44. Bishop D.K. Repair of heteroduplex plasmid DNA after transformation into *Saccharomyces cerevisiae* / Bishop D.K., Kolodner R.D. // Mol. Cell. Biol., 1986. - V.16. - P. 3401-3409. doi: 10.1128/mcb.6.10.3401-3409.1986

45. Rupp W.D. Discontinuities in the DNA synthesized in an excision-defective

strain of *Escherichia coli* following ultraviolet irradiation / Rupp W.D., Howard-Flanders P. // J Mol. Biol., 1968. -V.31. -№2. -P.291-304. doi: 10.1016/0022-2836(68)90445-2

46. Со́йфер В.Н. Репарация генетических повреждений / Со́йфер В.Н.// Соросовский образовательный журнал, 1997, -№8, - С. 4-13

47. Cussiol J.R. Slx4 Scaffolding in Homologous Recombination and Checkpoint Control: Lessons From Yeast / Cussiol J.R., Dibitto D., Pellicoli A., [et al] // Chromosoma, 2017. -V.126. -№1. -P.45–58. doi:10.1007/s00412-016-0600-y

48. Vydzhak O. Checkpoint adaptation in recombination-deficient cells drives aneuploidy and resistance to genotoxic agents / Vydzhak O., Bender K., Klermund J., [et al] // DNA Repair (Amst), 2020. -V.95. -№102939. doi: 10.1016/j.dnarep.2020.102939.

49. Crickard J.B. Helicase Mechanisms During Homologous Recombination in *Saccharomyces cerevisiae* / Crickard J.B., Greene E.C. // Annu. Rev. Biophys., 2019. -V.48. -P.255–273. doi:10.1146/annurev-biophys-052118-115418

50. Bellini A. Fission Yeast Rad52 Phosphorylation Restrains Error Prone Recombination Pathways / Bellini A., Girard P-M., Tessier L., [et al.]. // PLoS ONE. 2014. - V. 9. -№4. -P.e95788. doi: 10.1371/journal.pone.0095788

51. Ivanov E.L. *RADI* and *RAD10*, but not other excision repair genes, are required for double-strand break-induced recombination in *Saccharomyces cerevisiae* / Ivanov E.L., Haber J.E. // Mol. Cell. Biol., 1995. -V.15. -№4. -P.2245-2251. doi: 10.1128/MCB.15.4.2245

52. Harrington J.J. Functional domains within FEN-1 and RAD2 define a family of structure specific endonucleases: implications for nucleotide excision repair / Harrington J.J., Lieber M.R. // Genes Dev., 1994. -V.8. -№11. -P.1344-1355. doi: 10.1101/gad.8.11.1344

53. Fishman-Lobell J. Removal of nonhomologous DNA ends in double-strand break recombination: the role of the yeast ultraviolet repair gene *RADI* / Fishman-Lobell J., Haber J.A. // Science, 1992. -V.258. -№5081. -P.480-484. doi:

10.1126/science.1411547

54. Fishman-Lobell J. Two alternative pathways of double-strand break repair that are kinetically separable and independently modulated / Fishman-Lobell J., Rudin N., Haber J.A. // *Mol. Cell. Biol.*, 1992. -V.12. -№3. -P.1292-1303. doi: 10.1128/mcb.12.3.1292-1303.1992

55. Королев В.Г. Генетические эффекты излучений и механизмы репарации у дрожжей как тест-системы для радиационной безопасности / Королев В.Г. // *Наукова праця*, 2009. - Т.106. - вып.103. - С.9-12

56. Andersen P. Eukaryotic DNA damage tolerance and translesion synthesis through covalent modifications of PCNA / Andersen P., Xu F., Xiao W // *Cell Res.*, 2008. -V.18. -№1. -P.162-173. doi: 10.1038/cr.2007.114

57. Алексеева Е.А. Толерантность к повреждению ДНК у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* / Алексеева Е.А., Королев В.Г. // *Генетика*, 2021. -Т.57. - №4. -С.371-383. doi: 10.31857/S0016675821040020

58. Broomfield S. *MMS2*, encoding a ubiquitin-conjugating enzyme-like protein, is a member of the yeast error-free postreplication repair pathway / Broomfield S., Chow B.L., Xiao W // *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998. -V.95. -№10. -P.5678–5683. doi: 10.1073/pnas.95.10.5678

59. Ball L.G. The Rad5 helicase activity is dispensable for error-free DNA post-replication repair / Ball L.G., Xu X., Blackwell S., [et al] // *DNA Repair (Amst)*, 2014. - V.16. -P.74-83. doi: 10.1016/j.dnarep.2014.02.016

60. Torres-Ramos C.A. Requirement of *RAD5* and *MMS2* for Postreplication Repair of UV-Damaged DNA in *Saccharomyces cerevisiae* / Torres-Ramos C.A., Prakash S., Prakash L. // *Mol Cell Biol.*, 2002. -V.22. -№7. -P.2419-2426. doi: 10.1128/mcb.22.7.2419-2426.2002

61. Yang K. Chemical protein polyubiquitination reveals the role of a noncanonical polyubiquitin chain in DNA damage tolerance / Yang K., Gong P., Gokhale P., [et al] // *ACS Chem. Biol.*, 2014. -V.9. -№8. -P.1685-1691. doi: 10.1021/cb500133k

62. Hayashi M., Keyamura K., Hishida T. Cyclin-dependent kinase modulates

- budding yeast Rad5 stability during cell cycle / Hayashi M., Keyamura K., Hishida T. // PLoS One., 2018. -V.13. -№9. -P.e0204680. doi: 10.1371/journal.pone.0204680
63. Goodman M.F. Translesion DNA polymerases / Goodman M.F., Woodgate R // Cold Spring Harb Perspect. Biol., 2013. -V.5. -№10. doi: 10.1101/cshperspect.a010363
64. Lopes M. Multiple mechanisms control chromosome integrity after replication fork uncoupling and restart at irreparable UV lesions / Lopes M., Foiani M., Sogo J.M // Mol. Cell., 2006. -V.21. -P.15-27. doi: 10.1016/j.molcel.2005.11.015
65. Karras G I. The *RAD6* DNA damage tolerance pathway operates uncoupled from the replication fork and is functional beyond S phase / Karras G I., Jentsch S. // Cell., 2010. -V.141. -№2. -P.255-267. doi: 10.1016/j.cell.2010.02.028
66. Majka J. Replication protein A directs loading of the DNA damage checkpoint clamp to 5'-DNA junctions / Majka J., Binz S.K., Wold M.S., [et al] // JBC. 2006. -V.281. -P.27855-27861. doi: 10.1074/jbc.M605176200
67. Zou L. Replication protein A-mediated recruitment and activation of Rad17 complexes / Zou L., Liu D., Elledge S.J // PNAS., 2003. -V.100. -P.13827-13832. doi: 10.1073/pnas.2336100100
68. Murakami-Sekimata A. The *Saccharomyces cerevisiae* *RAD9*, *RAD17* and *RAD24* genes are required for suppression of mutagenic post-replicative repair during chronic DNA damage / Murakami-Sekimata A., Huang D., Piening B.D., [et al] // DNA Repair (Amst), 2010. -V.9. -№7. -P.824-834. doi: 10.1016/j.dnarep.2010.04.007
69. Takahashi T.S. Effects of chain length and geometry on the activation of DNA damage bypass by polyubiquitylated PCNA / Takahashi T.S., Wollscheid H-P., Lowther J., [et al] // Nucleic Acids Res., 2020. -V.48. -№6. -P.3042-3052. doi: 10.1093/nar/gkaa053
70. Bienko M. Ubiquitin-binding domains in Y-family polymerases regulate translesion synthesis / Bienko M., Green C.M., Crosetto N., [et al] // Science, 2005. -V. 310. -№5755. -P.1821-1824. doi: 10.1126/science.1120615
71. Pages V. Uncoupling of leading- and lagging-strand DNA replication during

lesion bypass *in vivo* / Pages V., Fuchs R.P // Science, 2003. -V. 300. -№5623. -P. 1300-1303. doi: 10.1126/science.1083964

72. Johnson R.E. Efficient bypass of a thymine-thymine dimer by yeast DNA polymerase Pol η / Johnson R.E., Prakash S., Prakash L. // Science, 1999. -V.283. -№5404. -P.1001-1004. doi: 10.1126/science.283.5404.1001

73. Gali V.K. Translesion synthesis DNA polymerase η exhibits a specific RNA extension activity and a transcription-associated function / Gali V.K., Balint E., Serbyn N., [et al] // Sci Rep., 2017. -V.7. -№1. -P.13055. doi: 10.1038/s41598-017-12915-1

74. Ripey B.M. Yeast DNA-polymerase η possesses two PIP-like motifs that bind PCNA and Rad6/Rad18 with different specificities / Ripey B.M., Reusch D.T., Washington M.T // DNA Repair (Amst), 2020. -V.95. -P.102968. doi: 10.1016/j.dnarep.2020.102968

75. Blastyák A. Yeast Rad5 protein required for postreplication repair has a DNA helicase activity specific for replication fork regression / Blastyák A., Pintér L., Unk I. [et al] // Mol Cell., 2007. -V.28. -P.167-175. doi: 10.1016/j.molcel.2007.07.030

76. Xu X. Involvement of budding yeast Rad5 in translesion DNA synthesis through physical interaction with Rev1 / Xu X., Lin A., Zhou C., [et al] // Nucleic Acids Res., 2016. -V.44. -№11. -P.13055. doi: 10.1093/nar/gkw183

77. Arbel M. Access to PCNA by Srs2 and Elg1 controls the choice between alternative repair pathways in *Saccharomyces cerevisiae* / Arbel M., Bronstein A., Sau S., [et al] // mBio., 2020. -V.11. -№3. -P.e00705-20. doi: 10.1128/mBio.00705-20

78. Fasullo M.T. Both RAD5-dependent and independent pathways are involved in DNA damage-associated sister chromatid exchange in budding yeast / Fasullo M.T., Sun M. // AIMS Genet., 2017. -V.4. -№2. -P.84-102. doi: 10.3934/genet.2017.2.84

79. Fan Q. Rad5 coordinates translesion DNA synthesis pathway by recognizing specific DNA structures in *S. cerevisiae* / Fan Q., Xu X., Zhao X., [et al] // Curr Genet., 2018. -V.64. -№4. -P.889-899. doi: 10.1007/s00294-018-0807-y

80. Bentsen I.B. MRX protects fork integrity at protein-DNA barriers, and its absence causes checkpoint activation dependent on chromatin context / Bentsen I.B.,

Nielsen I., Lisby M., [et al] // *Nucl. Acids Res.*, 2013. -V.41. -P.3173-3189. doi: 10.1093/nar/gkt051

81. Ball L.G. The Mre11-Rad50-Xrs2 complex is required for yeast DNA postreplication repair / Ball L.G., Hanna M.D., Lambrecht A.D., [et al] // *PLoS One.*, 2014. -V.9. -№10. -P.e109292. doi: 10.1371/journal.pone.0109292

82. Garcia-Rodrigues N. The helicase Pif1 functions in the template switching pathway of DNA damage bypass / Garcia-Rodrigues N., Wong R.P., Ulrich H.D // *Nucl. Acids Res.*, 2018. -V.46. -№ 16. -P.8347-8356. doi: 10.1093/nar/gky648

83. Ball L.G. The yeast Shu complex couples error-free post-replication repair to homologous recombination / Ball L.G., Zhang K., Cobb J.A. [et al] // *Mol. Microbiol.*, 2009. -V. 73. -№1. -P.89-102. doi: 10.1111/j.1365-2958.2009.06748.x

84. Xu X. The yeast Shu complex utilizes homologous recombination machinery for error-free lesion bypass via physical interaction with a Rad51 paralogue / Xu X., Ball L., Chen W. [et al] // *PLOS ONE.*, 2013. -V.8. -№12. -P.e81371. doi: 10.1371/journal.pone.0081371

85. Kolesar P. Pro-recombination role of *Srs2* protein requires SUMO (Small Ubiquitin-like Modifier) but is independent of PCNA (Proliferatingcell Nuclear Antigen) interaction / Kolesar P., Altmannova V., Silva S., [et al] // *J. Biochem.* 2016. -V.291. -№14. -P.7594-7607. doi: 10.1074/jbc.M115.685891

86. Н.Н. Хромов-Борисов, Jenifer Saffi, João A. P. Henriques. Упорядоченный посев и пуассонер – высокоточная техника количественной микробиологии. Журнал «Медицина XXI век» № 2-2008, с. 92-97

87. Lea, D.E., Coulson, C.A. The distribution of the numbers of mutants in bacterial populations. *J. Genet.* 1949, 49, 264–285, doi:10.1007/bf02986080

88. Ивантер Э.В., Коросов А.В. Основы биометрии: введение в статистический анализ биологических явлений и процессов / Ивантер Э.В., Коросов А.В // Петрозаводск: ПГУ, 1992. -С.168

89. Захаров И.А. Сборник методик по генетике дрожжей-сахаромицетов / Захаров И.А. [и др] // Л.: Наука, 1984. -изд.2-е. -С.144

90. Alekseeva E.A. Participation of the *HIM1* gene of yeast *Saccharomyces cerevisiae* in the error-free branch of post-replicative repair and role Pol η in *him1*-dependent mutagenesis / Alekseeva E.A., Evstyukhina T.A., Peshekhonov V.T., [et al] // *Curr Genet.*, 2021. -V.67. -№1. -P.141-151. doi: 10.1007/s00294-020-01115-6
91. Черненко А.Ю. Взаимодействие гена *HSM3* с генами, инициирующими гомологичную рекомбинационную репарацию у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* / Черненко А.Ю., Федоров Д.В., Грачева Л.М., [и др] // *Генетика*. 2012. -Т.48.- №3. -С.333–339.
92. Ede C. Budding yeast Mph1 promotes sister chromatid interactions by a mechanism involving strand invasion / Ede C., Rudolph C.J., Lehmann S., [et al] // *DNA Repair*. 2011. -V.10. -№1. -P.45-55. doi: 10.1016/j.dnarep.2010.09.009
93. Алексеева Е.А. Взаимодействие продукта гена *HIM1* с геликазами Srs2 (RadH) и Mph1 дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* / Алексеева Е.А., Евстюхина Т.А., Пешехонов В.Т., [и др] // *Цитология*. 2018. -Т.60. -№7. -С.555-557. doi: 10.31116/tsitol.2018.07.13
94. Keyamura K. Srs2 and Mus81-Mms4 prevent accumulation of toxic inter-homolog recombination intermediates / Keyamura K., Arai K., Hishida T. // *PLoS Genet.*, 2016. -V.12. -№7. -P.e1006136. doi: 10.1371/journal.pgen.1006136
95. Kaliraman V. Functional overlap between Sgs1-Top3 and the Mms4-Mus81 endonuclease / Kaliraman V., Muller J.R., Fricke W.M., [et al] // *Genes Dev.*, 2001. -V.15. -№20. -P.2730-2740. doi: 10.1101/gad.932201
96. Dieckman L.M. PCNA trimer instability inhibits translesion synthesis by DNA polymerase η and by DNA polymerase δ / Dieckman L.M., Washington M.T // *DNA Repair (Amst)*, 2013. -V.12. -№5. -P.367–376. doi:10.1016/j.dnarep.2013.02.007
97. Kozmin S.G. Roles of *Saccharomyces cerevisiae* DNA polymerases Pol η and Pol ζ in response to irradiation by simulated sunlight / Kozmin S.G., Pavlov Y.I., Kunkel T.A., [et al] // *Nucl.Acids Res.*, 2003. -V.31. -P.4541-4552. doi:10.1093/nar/gkg489
98. Travesa A. Distinct phosphatases mediate the deactivation of the DNA damage checkpoint kinase Rad53 / Travesa A., Duch A., Quintana D.G. // *J. Biol. Chem.*

2008. -V.283. -P.17123–17130. doi: 10.1074/jbc.M801402200

99. Zhao X. A Suppressor of Two Essential Checkpoint Genes Identifies a Novel Protein that Negatively Affects dNTP Pools / Zhao X., Muller E.G.D., Rothstein R // *Molecular Cell.*, 1998. -V.2. -№.3. -P.329–340. doi: 10.1016/s1097-2765(00)80277-4

100. Chabes A. Yeast Sml1, a Protein Inhibitor of Ribonucleotide Reductase / Chabes A., Domkin V., Thelander L // *J Biol Chem.*, 1999. -V.274. -№.51. -P.36679–36683. doi: 10.1074/jbc.274.51.36679

101. Sanvisens N. Yeast Dun1 kinase regulates ribonucleotide reductase small subunit localization in response to iron deficiency / Sanvisens N., Romero A.M., Zhang C., [et al] // *J Biol Chem.*, 2016. -V.291. -№.18. -P.9807-9817. doi: 10.1074/jbc.M116.720862

102. Domkin V. Yeast DNA damage-inducible Rnr3 has a very low catalytic activity strongly stimulated after the formation of a cross-talking Rnr1/Rnr3 complex / Domkin V., Thelander L., Chabes A // *J Biol Chem.*, 2002. -V.277. -№.21. -P.18574-18578. doi: 10.1074/jbc.M201553200

103. Corcoles-Saez I. Functional link between mitochondria and RNR3, the minor catalytic subunit of yeast ribonucleotide reductase / Corcoles-Saez I., Ferat J-L., Costanzo M., [et al] // *Microb Cell.*, 2019. -V.6. -№.6. -P.286-294. doi: 10.15698/mic2019.06.680

104. Rong L. Purification and characterization of the SRS2 DNA helicase of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* / Rong L., Klein H.L. // *J Biol Chem.* 1993. -V.268. -№.2. -P.1252-9. PMID: 8419328

105. Dupaigne P. The Srs2 helicase activity is stimulated by Rad51 filaments on dsDNA: implications for crossover incidence during mitotic recombination / Dupaigne P., Le Breton C., Fabre F., [et al.] // *Mol Cell.* 2008. -V.29. -№.2. -P.243-54. doi: 10.1016/j.molcel.2007.11.033

106. Colavito S. Functional significance of the Rad51-Srs2 complex in Rad51 presynaptic filament disruption / Colavito S., Macris-Kiss M., Seong C., [et al] // *Nucleic Acids Res.* 2009. -V.37. -№.20. -P.6754-64. doi: 10.1093/nar/gkp748

107. Panico E.R. Genetic evidence for a role of *Saccharomyces cerevisiae* Mph1 in recombinational DNA repair under replicative stress / Panico E.R., Ede C., Schildmann M., [et al.] // *Yeast*. 2010. -V.27. -№1. -P.11-27. doi: 10.1002/yea.1727
108. Prakash R. Yeast Mph1 helicase dissociates Rad51-made D-loops: implications for crossover control in mitotic recombination. Prakash R., Satory D., Dray E., [et al] // *Genes*. 2009. -V.23. -№1. -P.67-79. doi: 10.1101/gad.1737809
109. Kim H. Suppression of a DNA polymerase delta mutation by the absence of the high mobility group protein Hmo1 in *Saccharomyces cerevisiae* / Kim H., Livingston D.M // *Curr Genet*. 2009. -V.55. -№2. -P.127-38. doi: 10.1007/s00294-009-0229-y
110. Gonzalez-Huici V. DNA bending facilitates the error-free DNA damage tolerance pathway and upholds genome integrity / Gonzalez-Huici V., Szakal B., Urulangodi M., [et al.] // *EMBO J*. 2014. -V.33.- №4. -P.327–340. doi: 10.1002/emboj.201387425

ПРИЛОЖЕНИЕ 1

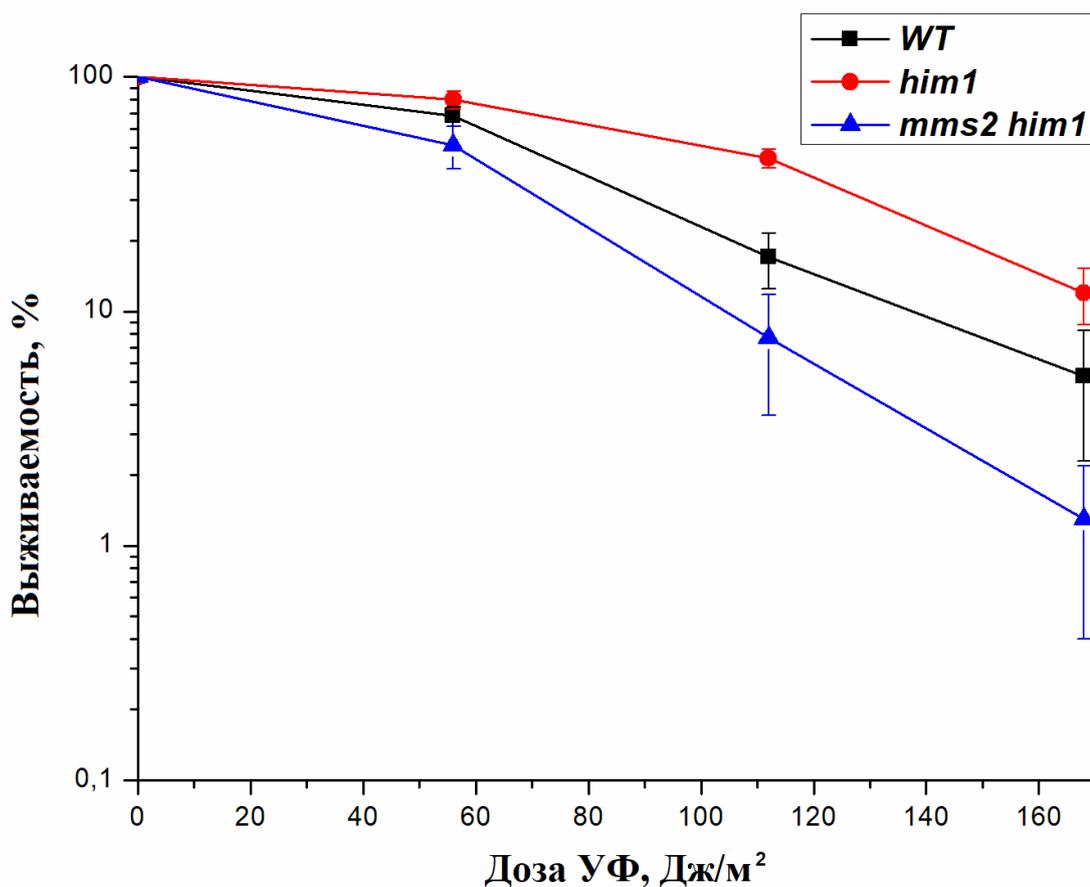
Чувствительность к УФ-свету штамма дикого типа и мутантных штаммов *him1Δ* и *him1Δ mms2Δ*

Рисунок 1. Чувствительность к УФ-свету штамма дикого типа (11D-3031) и мутантов *him1Δ* (1-ЕАА-3031) и *him1Δ mms2Δ* (7-ЕАА-3031). На графике нанесены средние значения \pm SEM, полученные в 4 независимых экспериментах

Чувствительность к УФ-свету штамма дикого типа и мутантных штаммов *him1Δ* и *him1Δ xrs2Δ*

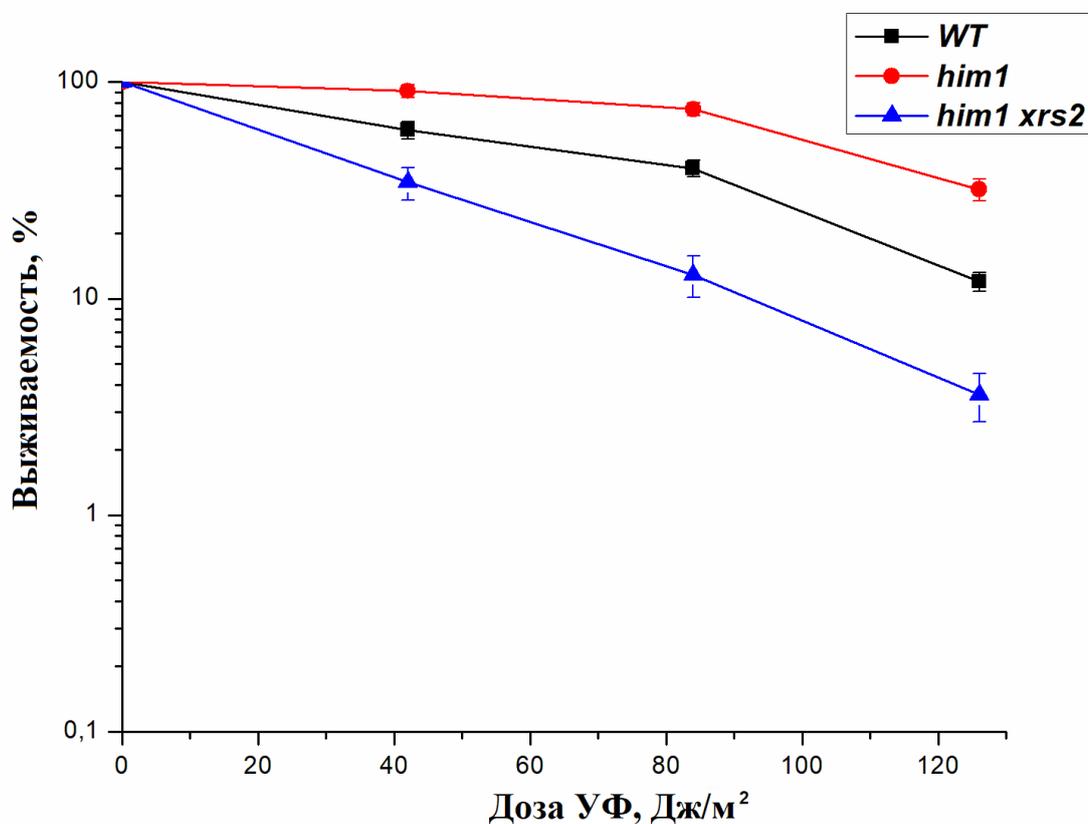


Рисунок 2. Чувствительность к УФ-свету штамма дикого типа (11D-3031) и мутантов *him1Δ* (1-EAA-3031) и *him1Δ xrs2Δ* (8-EAA-3031). На графике нанесены средние значения \pm SEM, полученные в 4 независимых экспериментах

Чувствительность к УФ-свету штамма дикого типа и мутантных штаммов *him1Δ*, *mph1Δ* и *mph1Δ him1Δ*

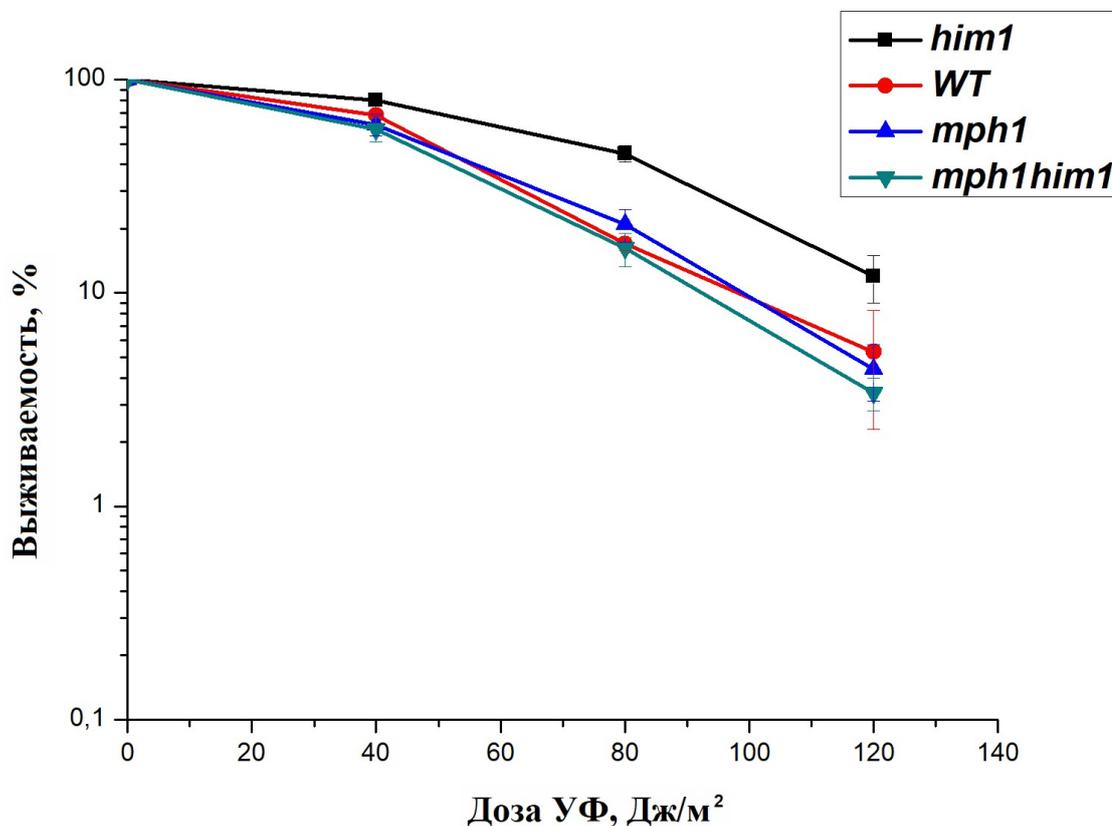


Рисунок 3. Чувствительность к УФ-свету штамма дикого типа (11D-3031) и мутантных штаммов *him1Δ* (1-ЕАА-3031), *mph1Δ* (3-ТАЕ-3031) и *mph1Δ him1Δ* (9-ЕАА-3031). На графике нанесены средние значения \pm SEM, полученные в 4 независимых экспериментах

Чувствительность к УФ-свету штамма дикого типа и мутантных штаммов *him1Δ*, *mms4Δ*, *him1Δ mms4Δ*

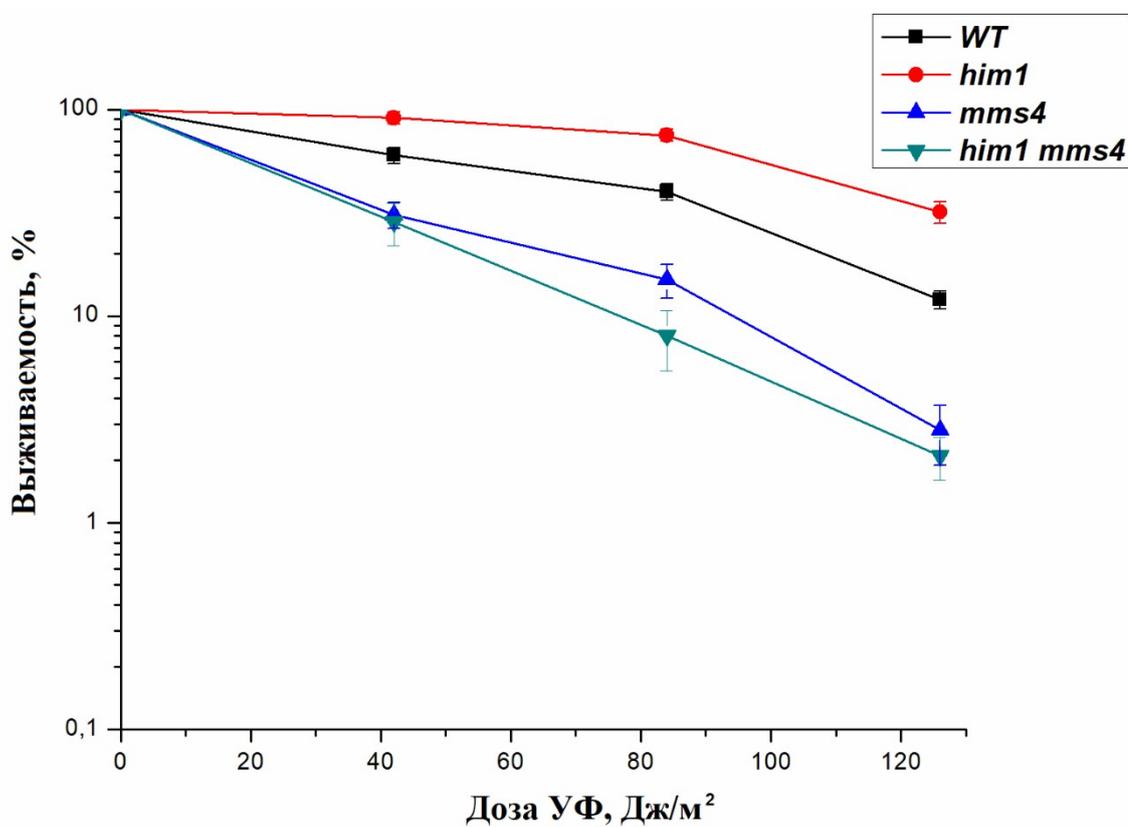


Рисунок 4. Чувствительность к УФ-свету штамма дикого типа (11D-3031) и мутантных штаммов *him1Δ* (1-ЕАА-3031), *mms4Δ* (5-ТАЕ-3031), *him1Δ mms4Δ* (13-ЕАА-3031). На графике нанесены средние значения \pm SEM, полученные в 4 независимых экспериментах

Чувствительность к УФ-свету штамма дикого типа и мутантных штаммов *him1Δ*, *rad30Δ* и *him1Δ rad30Δ*

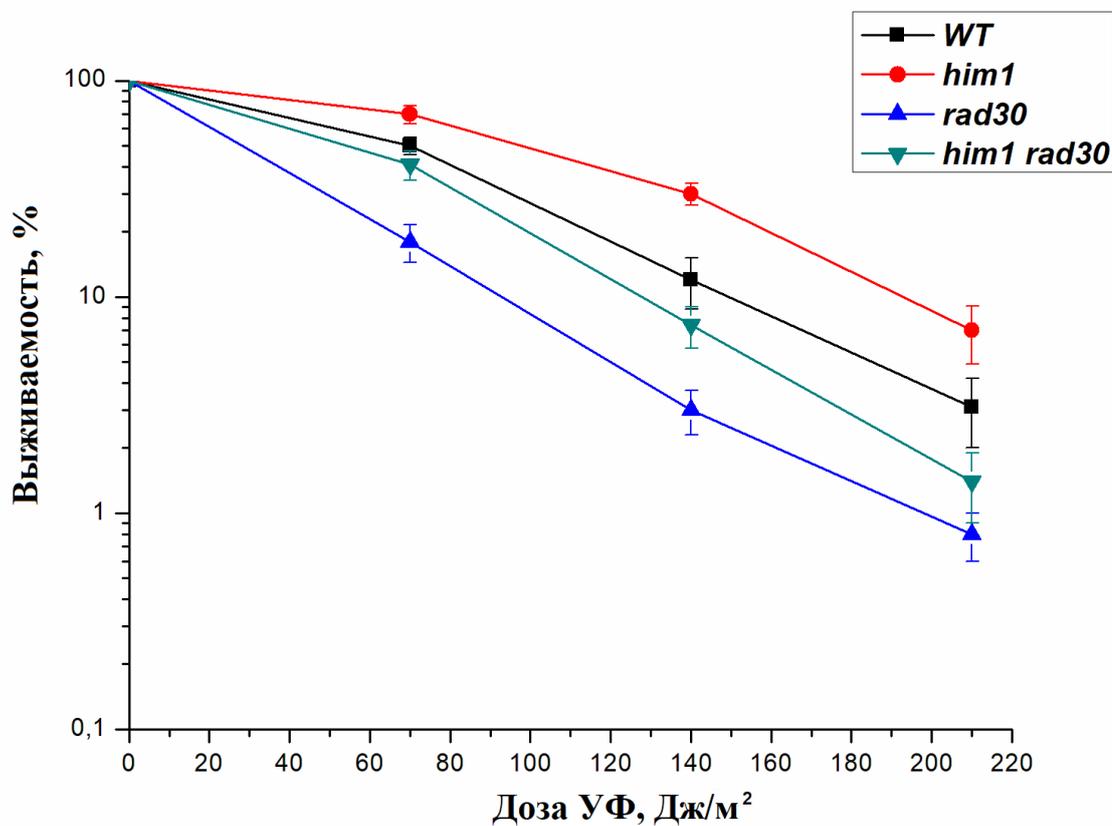


Рисунок 5. Чувствительность к УФ-свету штамма дикого типа (11D-3031) и мутантных штаммов *him1Δ* (1-ЕАА-3031), *rad30Δ* (4-ЕАА-3031) и *him1Δ rad30Δ* (5-ЕАА-3031). На графике нанесены средние значения \pm SEM, полученные в 4 независимых экспериментах

Чувствительность к УФ-свету штамма дикого типа и мутантных штаммов *him1Δ*, *rad53-C (rad53-НА-F)*, *him1Δ rad53-C (him1 Δrad53-НА-F)*

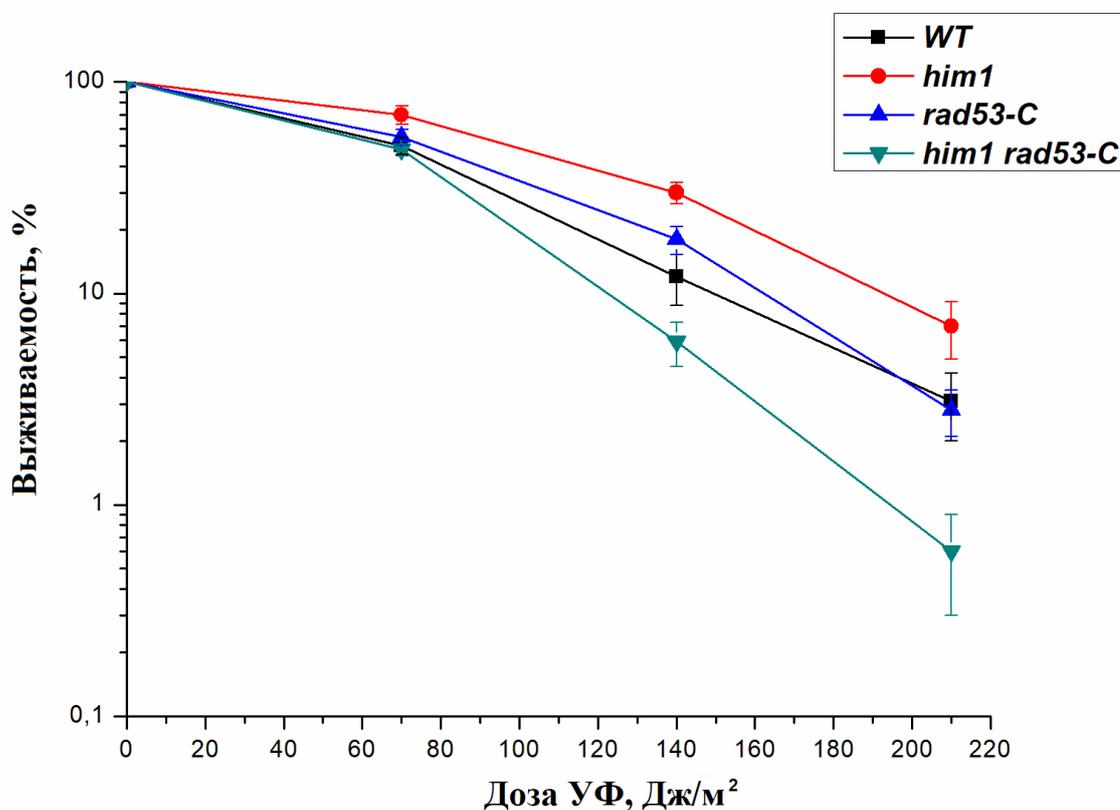


Рисунок 6. Чувствительность к УФ-свету штамма дикого типа (11D-3031) и мутантных штаммов *him1Δ* (1-EAA-3031), *rad53-C (rad53-НА-F)* (10-DVF-3031), *him1Δ rad53-C (him1 Δrad53-НА-F)* (9-DVF-3031). На графике нанесены средние значения \pm SEM, полученные в 4 независимых экспериментах

Чувствительность к УФ-свету штамма дикого типа и мутантных штаммов *him1Δ*, *pph3Δ* и *pph3Δ him1Δ*

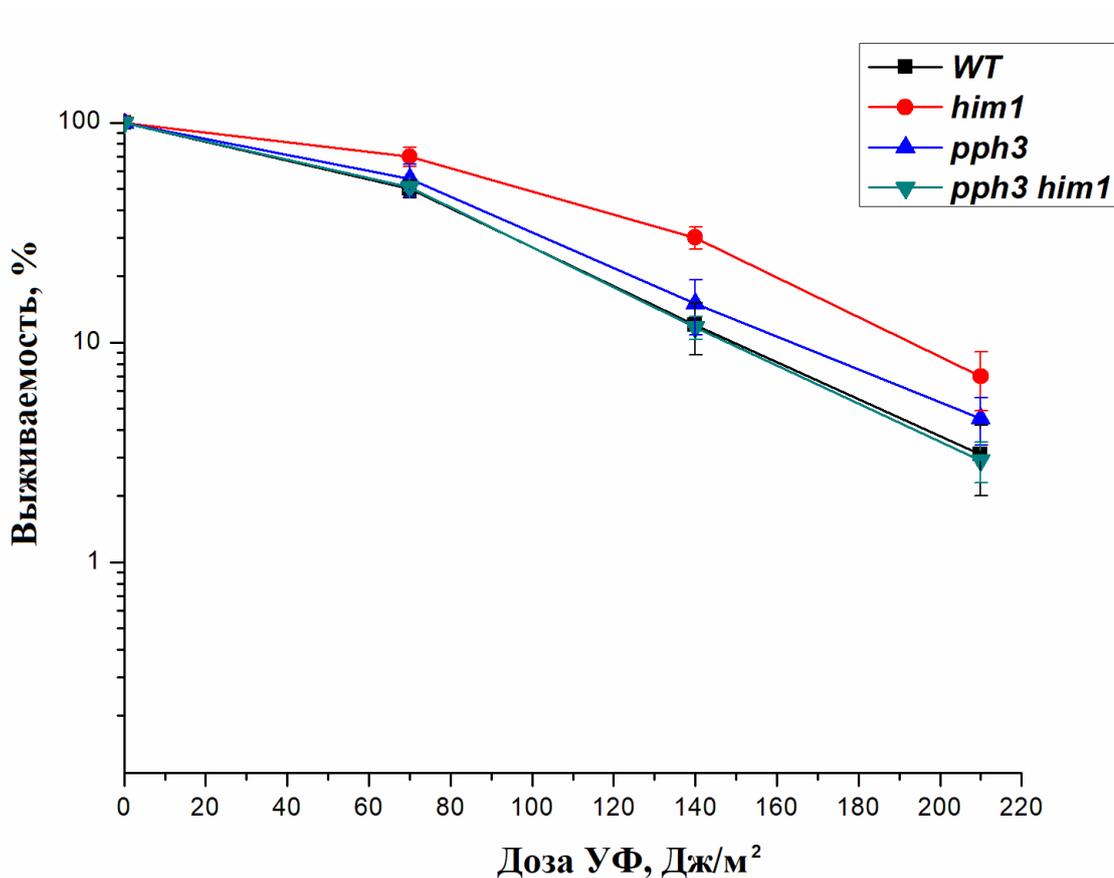


Рисунок 7. Чувствительность к УФ-свету штамма дикого типа (11D-3031) и мутантных штаммов *him1Δ* (1-EAA-3031), *pph3Δ* (9-DVF-3031) и *pph3Δ him1Δ* (11-EAA-3031). На графике нанесены средние значения \pm SEM, полученные в 4 независимых экспериментах

Чувствительность к УФ-свету штамма дикого типа и мутантных штаммов *him1Δ*, *psy4Δ* и *psy4Δ him1Δ*

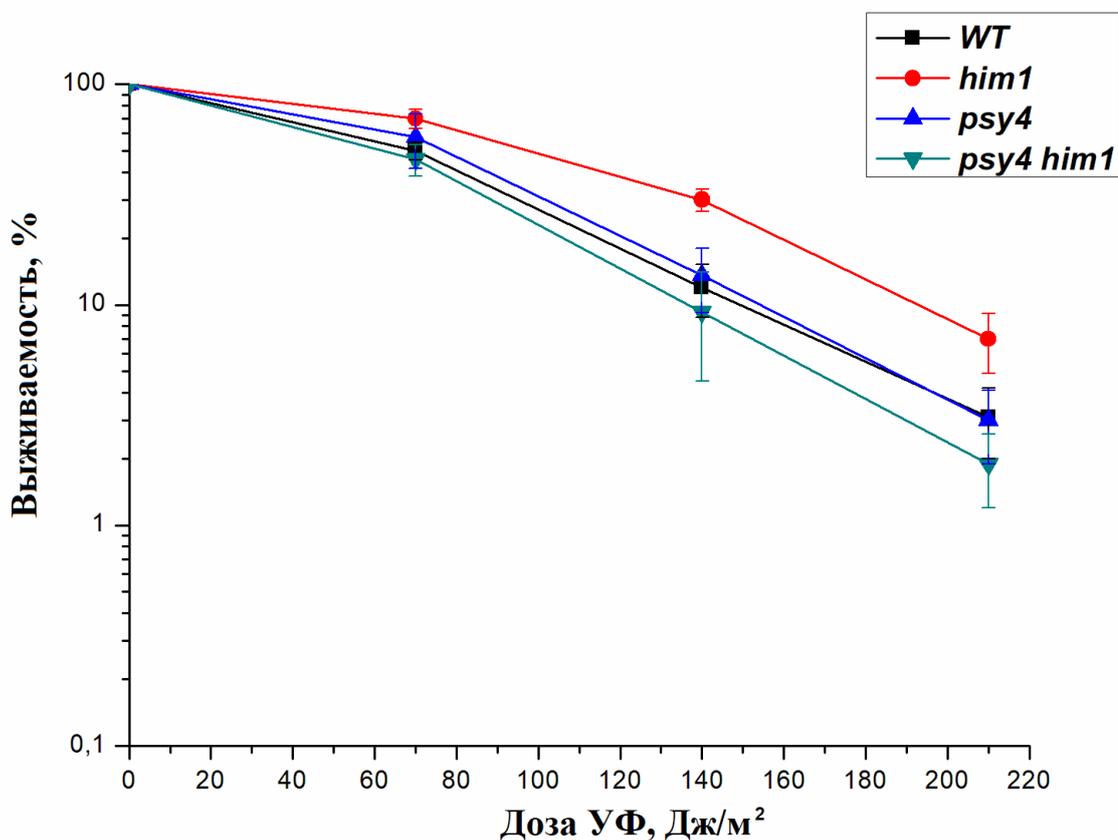


Рисунок 8. Чувствительность к УФ-свету штамма дикого типа (11D-3031) и мутантных штаммов *him1Δ* (1-EAA-3031), *psy4Δ* (10-DVF-3031) и *psy4Δ him1Δ* (12-EAA-3031). На графике нанесены средние значения \pm SEM, полученные в 4 независимых экспериментах

Чувствительность к УФ-свету штамма дикого типа и мутантных штаммов *him1Δ*, *sml1Δ* и *sml1Δ him1Δ*

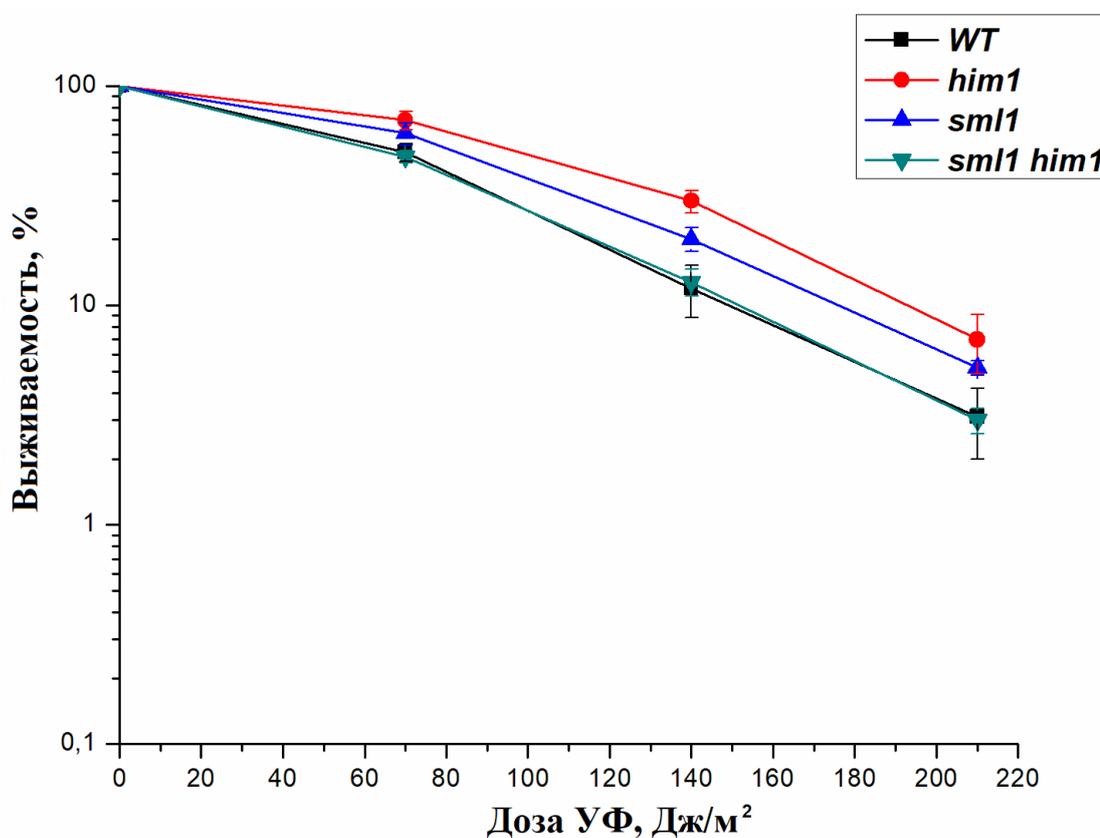


Рисунок 9. Чувствительность к УФ-свету штамма дикого типа (11D-3031) и мутантных штаммов *him1Δ* (1-EAA-3031), *sml1Δ* (6-DVF-3031) и *sml1Δ him1Δ* (7-DVF-3031). На графике нанесены средние значения \pm SEM, полученные в 4 независимых экспериментах

Чувствительность к УФ-свету штамма дикого типа и мутантных штаммов *him1Δ*, *dun1Δ* и *dun1Δ him1Δ*

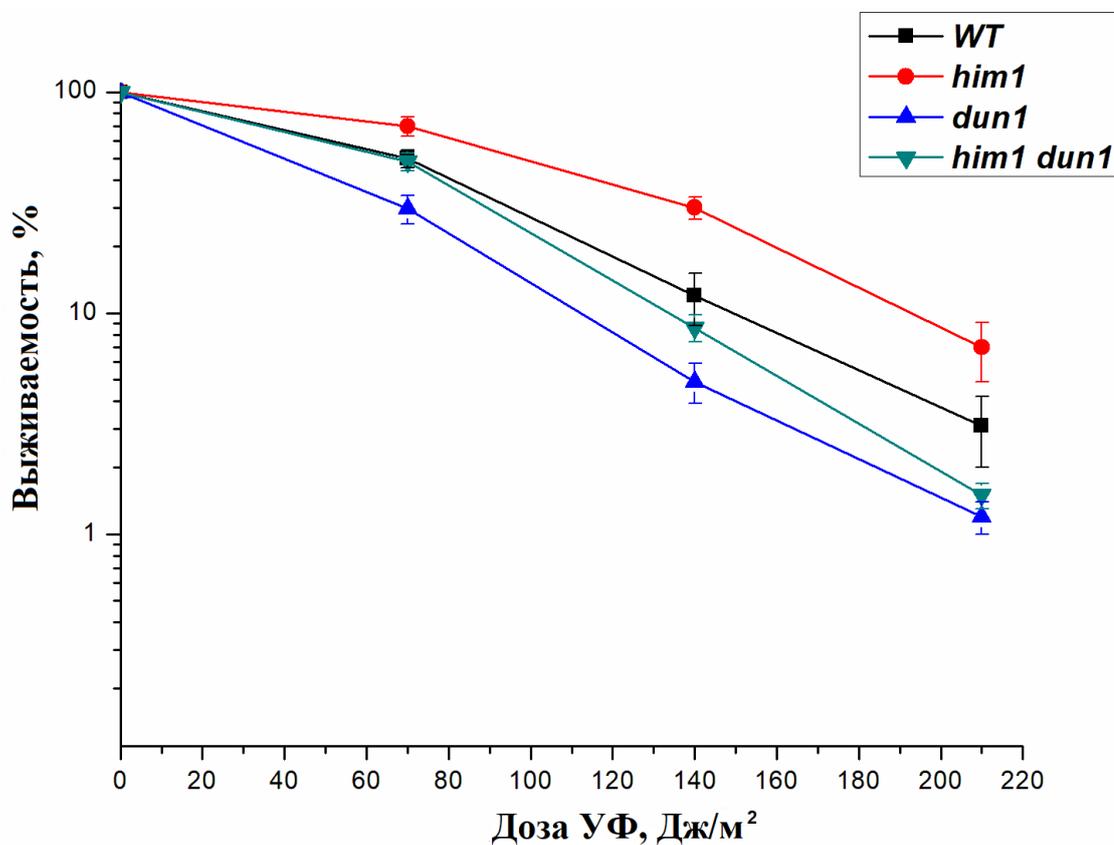


Рисунок 10. Чувствительность к УФ-свету штамма дикого типа (11D-3031) и мутантных штаммов *him1Δ* (1-EAA-3031), *dun1Δ* (8-DVF-3031) и *dun1Δ him1Δ* (2-EAA-3031). На графике нанесены средние значения \pm SEM, полученные в 4 независимых экспериментах

БЛАГОДАРНОСТИ

Выражаю искреннюю благодарность своему научному руководителю Владимиру Геннадиевичу Королеву за неоценимую помощь в написании данной работы и постоянную поддержку.

Благодарю Татьяну Анатольевну Евстюхину и Дмитрия Владимировича Федорова за помощь в освоении микробиологических методов и методов классической генетики.

Искренне благодарю Юлию Александровну Ильину за помощь в освоении методики «Полимеразная цепная реакция в реальном времени».

Благодарю Вячеслава Тимофеевича Пешехонова за помощь в освоении молекулярно-генетических методов.

Выражаю благодарность Валерию Николаевичу Вербенко за критические замечания по содержанию и оформлению данной работы.

Хочу поблагодарить всех сотрудников Лаборатории генетики эукариот ОМРБ НИЦ «Курчатовский институт» - ПИЯФ за поддержку и опору.