

На правах рукописи

АЛЕКСЕЕВА Елена Анатольевна

**РОЛЬ ГЕНА *HIM1* В РЕГУЛЯЦИИ МУТАЦИОННОГО ПРОЦЕССА У
ДРОЖЖЕЙ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE***

Специальность: 1.5.7 - Генетика

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Гатчина 2022

Работа выполнена в группе генетических исследований хроматина и репарации лаборатории экспериментальной генетики (бывшей Лаборатории генетики эукариот) отделения молекулярной и радиационной биофизики ФГБУ Петербургского института ядерной физики им. Б.П. Константинова НИЦ «Курчатовский институт»

Научный руководитель: доктор биологических наук,
КОРОЛЕВ Владимир Геннадиевич,
НИЦ «Курчатовский институт»-ПИЯФ,
ведущий научный сотрудник

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, доцент,
ЖУРАВЛЕВА Галина Анатольевна,
Санкт-Петербургский государственный
университет, профессор

доктор биологических наук, профессор,
МАНУХОВ Илья Владимирович,
Московский физико-технический институт
(национальный исследовательский
университет), заведующий лабораторией
молекулярной генетики

Ведущая организация: Объединенный институт ядерных исследований,
г. Дубна

Защита состоится «__» _____ 20__ г. в ____ часов на заседании диссертационного совета 24.1.088.01 в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук по адресу: 119991, Москва, ул. Губкина, 3.

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Института www.vigg.ru, тел. 8-499-135-14-31.

Автореферат разослан «__» _____ 20__ года.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор биологических наук

Горячева И.И.

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, контролируемых различными этапами 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»-ПНПФ, 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 *HIM1* 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, радиэкологии и эволюции: GRRE2021» 5-9 октября 2021г., 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.

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.

Финансовая поддержка работы. 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.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Обзор литературы

Дана характеристика объекта исследования, обобщены современные представления о системах репарации, подробно рассмотрена пострепликативная репарация у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*.

2. Материалы и методы

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

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

Штамм	Генотип	Краткое обозначение
11D-3031	<i>MATa ade2Δ-248 ura3-160, 188leu23, 112trp1</i>	<i>2a</i>
1-EAA-3031	<i>MATa ade2Δ-248 ura3-160,188 leu2-3,112 trp1 him1:: URA3</i>	<i>him1Δ</i>
6-DVF-3031	<i>MATa ade2Δ-248 ura3-160,188 leu2-3,112 trp1 sml1:: kanMX</i>	<i>sml1Δ</i>
7- DVF-3031	<i>MATa ade2Δ-248 ura3-160,188 leu2-3,112 trp1 sml1:: kanMX him1:: URA3</i>	<i>sml1Δ him1Δ</i>
4-EAA-3031	<i>MATa ade2Δ-248 ura3-160,188 leu2-3,112 trp1rad30:: kanMX</i>	<i>rad30Δ</i>
5-EAA-3031	<i>MATa ade2Δ-248 ura3-160,188 leu2-3,112 trp1rad30:: kanMX him1:: URA3</i>	<i>him1Δ rad30Δ</i>
6-EAA-3031	<i>MATa ade2Δ-248 ura3-160,188 leu2-3,112 trp1 mms2:: kanMX</i>	<i>mms2Δ</i>
7-EAA-3031	<i>MATa ade2Δ-248 ura3-160,188 leu2-3,112 trp1 mms2:: kanMX him1:: URA3</i>	<i>him1Δ mms2Δ</i>
2-TAE-3031	<i>MATa ade2Δ-248 ura3-160,188 leu2-3,112 trp1 xrs2:: URA3</i>	<i>xrs2Δ</i>
8-EAA-3031	<i>MATa ade2Δ-248 ura3-160,188 leu2-3,112 trp1 xrs2:: URA3 him1Δ</i>	<i>him1Δ xrs2Δ</i>
8-DVF-3031	<i>MATa ade2Δ-248 ura3-160,188 leu2-3,112 trp1 dun1:: kanMX</i>	<i>dun1Δ</i>
2-EAA-3031	<i>MATa ade2Δ-248 ura3-160,188 leu2-3,112 trp1 dun1:: kanMX him1:: URA3</i>	<i>dun1Δ him1Δ</i>
3-TAE-3031	<i>MATa ade2Δ-248 ura3-160, 188leu23, 112trp1 mph1:: kanMX</i>	<i>mph1Δ</i>
9-EAA-3031	<i>MATa ade2Δ-248 ura3-160, 188leu23, 112trp1 mph1:: kanMX him1:: URA3</i>	<i>mph1Δ him1Δ</i>
4-TAE-3031	<i>MATa ade2Δ-248 ura3-160, 188leu23, 112trp1 srs2::LEU2</i>	<i>srs2Δ</i>
10-EAA-3031	<i>MATa ade2Δ-248 ura3-160, 188leu23, 112trp1 him1:: URA3 srs2::LEU2</i>	<i>him1Δ srs2Δ</i>
9-DVF-3031	<i>MATa ade2Δ-248 ura3-160, 188leu23, 112trp1 pph3:: kanMX</i>	<i>pph3Δ</i>
11-EAA-3031	<i>MATa ade2Δ-248 ura3-160, 188leu23, 112trp1 pph3:: kanMX him1:: URA3</i>	<i>pph3Δ him1Δ</i>

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

Получение мутантных штаммов

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

Для получения мутантного штамма *him1Δ* использовали плазмиду pUCH370, полученную в работе Келберг [1] (Рисунок 1). 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 1. 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.

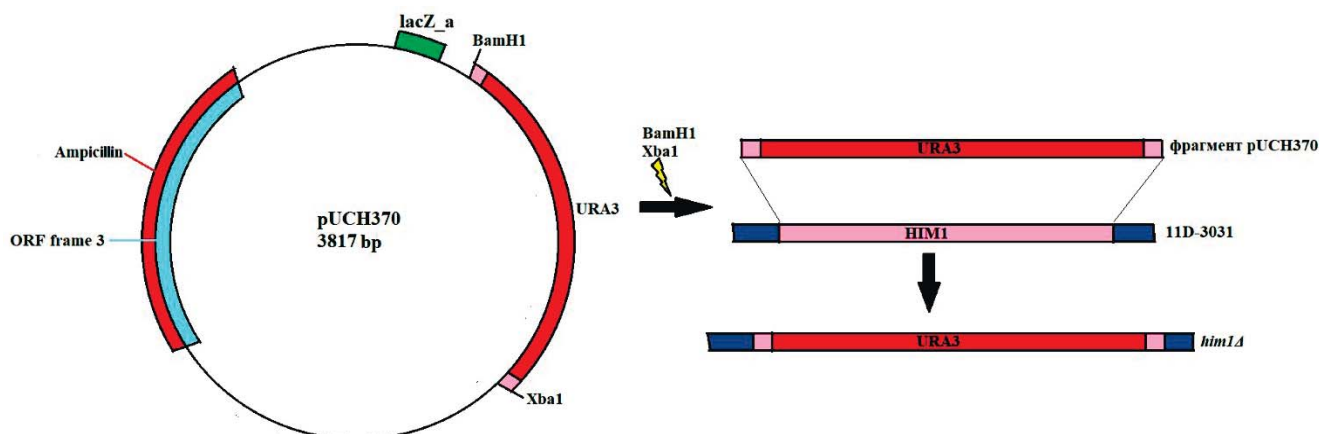


Рисунок 1. Карта плазмиды pUCH370 и схема получения делеционного мутанта *him1Δ*

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*: ForRNR3 5'-ACACSTTTCATGGTTTATAAG-3' и RevRNR3 5'-CGACGATTTTACAACATAA-3'; для гена *ACT1*: ForACT1 5'-GAAGGTCAAGATCATTCGC-3 и RevACT1 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. 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.

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'-CACAACCCTCTTTTCACGACG-3 и 5'-GGAAACCCCAACCTAAGAACC-3').

Помимо приведенных выше методик в работе указаны составы питательных сред, а также условия культивирования штаммов. Описаны основные методы работы с дрожжевыми клетками, метод учета чувствительности клеток дрожжей к летальному действию мутагенов, методы учета частот возникновения индуцированных и спонтанных мутаций, метод трансформации клеток, методы выделения ДНК и РНК, статистические методы обработки данных.

3. Результаты и обсуждение

3.1. Участие гена *HIM1* в контроле безошибочной ветви пострепликативной репарации

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 [1,2] 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 рисунке 2 по мутанту *mms2Δ*, и по мутанту *xrs2Δ* (данные не представлены), 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.

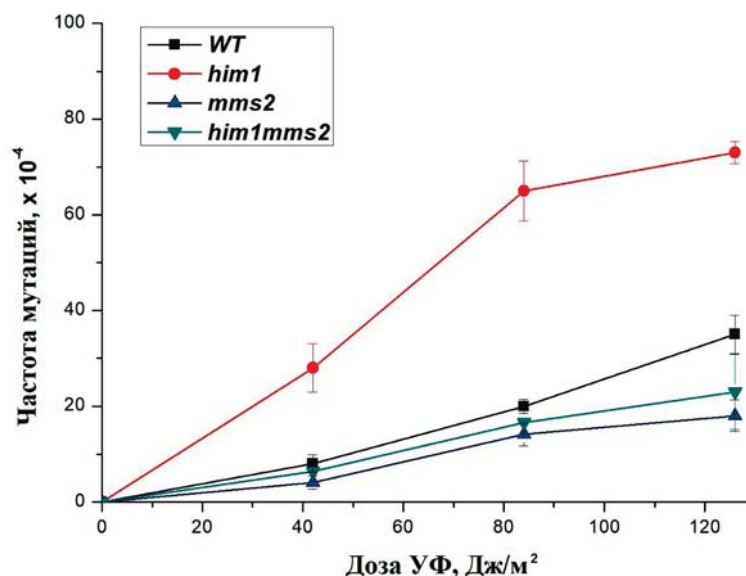


Рисунок 2. УФ-индуцированный мутагенез в локусах ADE4-ADE8 у штамма дикого типа (11D-3031) и мутантов *him1Δ* (1-ЕАА-3031), *mms2Δ* (6-ЕАА-3031) и *him1Δ mms2Δ* (7-ЕАА-3031). На графике здесь и далее нанесены средние значения \pm SEM, полученные в 4 независимых экспериментах

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 иницирующих комплексов.

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

На каком этапе процесса ПРР принимает участие *HIM1*? В результате деградации вновь синтезированной ДНК, осуществляемой комплексом MRX (Mre11/Rad50/Xrs2), происходит расширение однострессовой бреши ДНК и освобождение 3'-конца от репликативного комплекса. Далее 3'-конец откручивается от комплементарной нити с помощью, предположительно, геликазы Pif1 и инициирует рекомбинационный процесс с сестринской хроматидой. На первом этапе этого процесса образуется D-петля. Здесь мы показали, что инактивация двух антирекомбинационных геликаз Srs2 (Рисунок 3) и Mph1(данные не представлены), которые разрушают D-петли, подавляет *him1*-зависимый мутагенез [4].

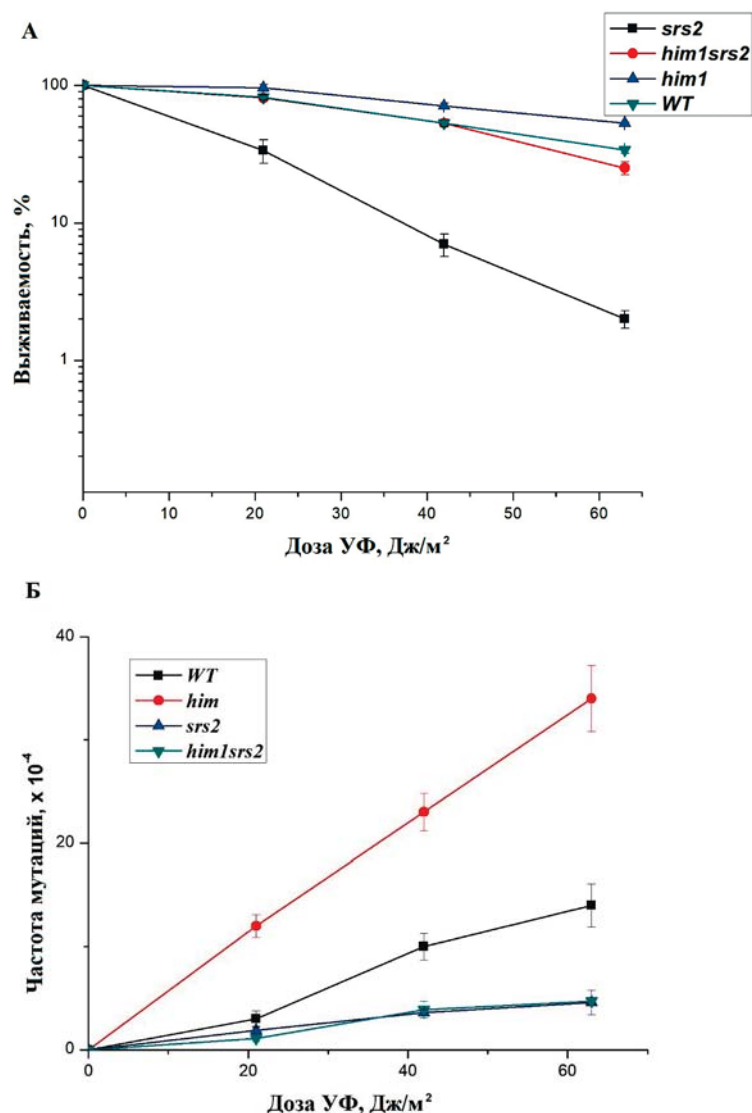


Рисунок 3. А) Чувствительность к УФ-свету и Б) УФ-индуцированный мутагенез в локусах *ADE4-ADE8* у штамма дикого типа (11D-3031) и мутантных штаммов *him1Δ* (1-EAA-3031), *srs2Δ* (4-TAE-3031) и *him1Δ srs2Δ* (10-EAA-3031)

Обе эти геликазы дестабилизируют D-петли и уменьшают среднюю длину синтезируемого участка ДНК [5,6]. 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* [2,7,8,9]. 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 [10,11]. В клетках дикого типа средняя длина синтезированной ДНК, как правило, превышает среднюю длину застраиваемой бреши. 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* (данные не представлены).

3.3. Взаимодействие генов *HIM1* и *RAD30*

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 (Polη) (данную полимеразу кодирует ген *RAD30*) к синтезу ДНК в бреши. В соответствии с этим предположением мы обнаружили, что инактивация Polη (мутация *rad30Δ*) полностью блокирует *him1*-зависимый УФ-индуцированный мутагенез (Рисунок 4).

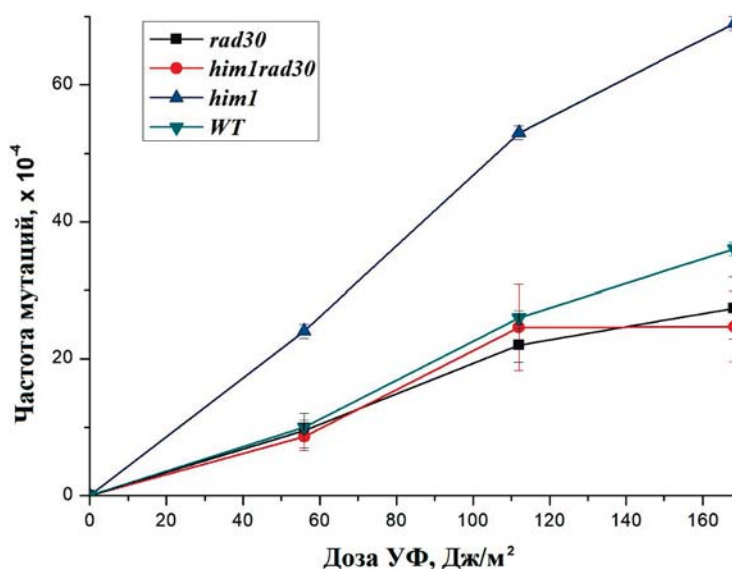


Рисунок 4. УФ-индуцированный мутагенез в локусах *ADE4-ADE8* у штамма дикого типа (11D-3031) и мутантных штаммов *him1Δ* (1-EAA-3031), *rad30Δ* (4-EAA-3031) и *him1Δ rad30Δ* (5-EAA-3031)

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 (Таблица 2).

Таблица 2. Типы замен оснований, индуцированных УФ-светом

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

С другой стороны, наши данные показали, что Polη-зависимый мутагенез в сайтах NBP (небипиримидиновые сайты) встречается значительно чаще у мутанта *him1Δ*, чем у двойного мутанта *him1Δ rad30Δ* (Рисунок 5). Этот результат свидетельствует о том, что во время ПРР Polη эффективно работает на неповрежденной матрице.

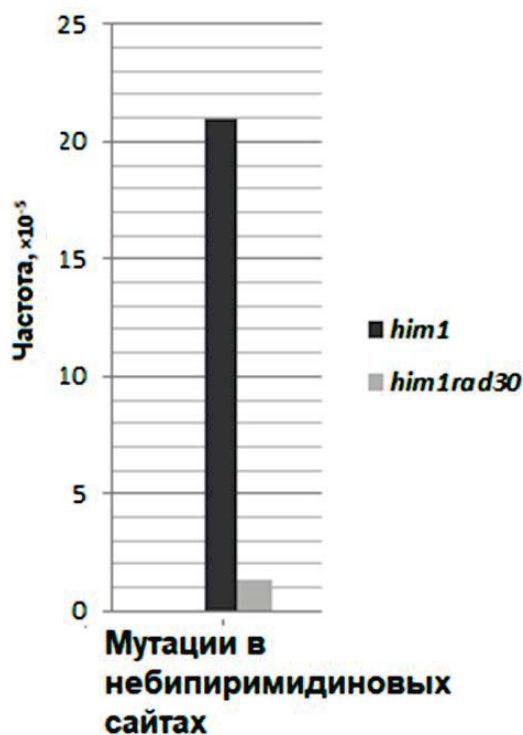


Рисунок 5. Частота мутаций в небипиримидиновых сайтах у штаммов *him1Δ* (1-ЕАА-3031) и *him1Δ rad30Δ* (5-ЕАА-3031)

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 бреши и оставшаяся ее часть заполняется часто ошибающейся Polη. Почему это происходит? Дело в том, что Polη в отличие от Polδ не обладает нитевытесняющей способностью, из-за этого она не может работать в D-петле. А после разрушения D-петли вероятность того, что в оставшейся бреши 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 брешу. 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.

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

Пострепликативная репарация инициируется после активации чекпойнта — механизма регулирующего остановку клеточного цикла. Этот механизм в клетках эукариот координирует остановку клеточного цикла и репарацию ДНК [12], также он связан с такими клеточными механизмами как, рекомбинационная репарация, ремодулирование структуры хроматина и пострепликативная репарация.

Киназа Rad53, является одной из основных киназ, контролирующих чекпойнт [13]. Активный Rad53 индуцирует значительное увеличение концентрации дНТФ для обеспечения репаративного синтеза пострепликативных брешей ДНК.

Было показано, что некоторые фосфатазы специфически продуцируют различные формы модификаций Rad53, которые необходимы для адекватного ответа на определенные повреждения ДНК [14]. 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].

Известно, что фосфатаза Pph3 предпочтительно дефосфорилирует C-концевые участки белка Rad53. Мы предположили, что нарушение структуры C-концевого участка белка может приводить к нарушению некоторых функций Rad53. Чтобы проверить это предположение, мы использовали измененную, добавлением в рамку считывания последовательности HA-F (гемагглютинин эпитопа вируса гриппа), C-концевую последовательность белка Rad53, что привело к значительному снижению активности киназы.

Мы проверили взаимодействие мутации *him1 Δ* с мутациями *rad53-HA-F* (*him1 Δ rad53-C*) (Рисунок 6), *pph3 Δ* и *psy4 Δ* (данные не представлены).

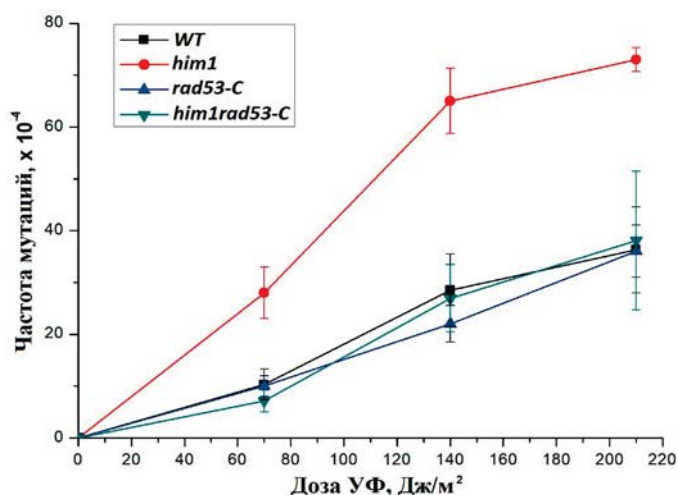


Рисунок 6. УФ-индуцированный мутагенез в локусах *ADE4-ADE8* у штамма дикого типа (11D-3031) и мутантных штаммов *him1Δ* (1-EAA-3031), *rad53-C* (*rad53-HA-F*) (10-DVF-3031), *him1Δ rad53-C* (*him1 Δrad53-HA-F*) (9-DVF-3031)

Как видно из рисунка 6 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.

У мутантов *pph3Δ him1Δ* и *psy4Δ him1Δ* при этом наблюдалось 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.

Таким образом можно предположить, что мутация *him1Δ* влияет на активность киназы Rad53.

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

Известно, что скорость синтеза ДНК зависит от концентрации дНТФ, которая зависит от активности киназы Rad53. Отсюда мы сделали предположение, что мутация *him1Δ* приводит к снижению концентрации дНТФ в клетках мутанта *him1Δ*, 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 7).

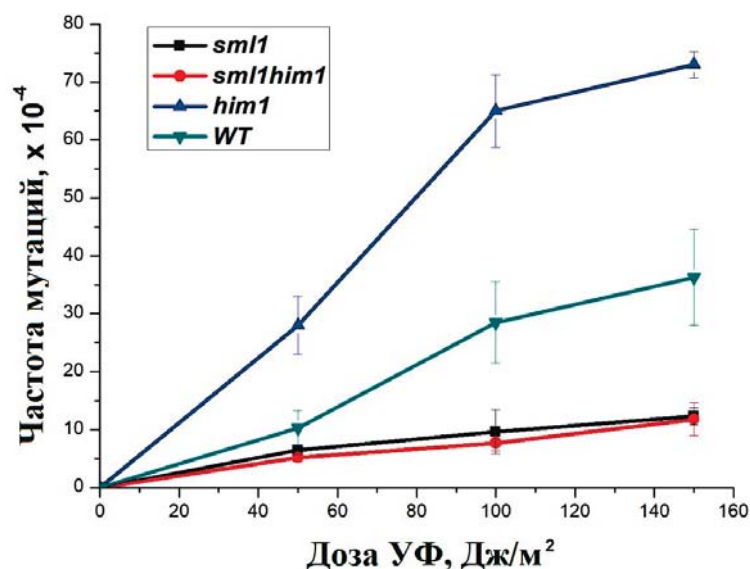


Рисунок 7. УФ-индуцированный мутагенез в локусах *ADE4-ADE8* у штамма дикого типа (11D-3031) и мутантных штаммов *him1Δ* (1-EAA-3031), *sml1Δ* (6-DVF-3031) и *sml1Δ him1Δ* (7-DVF-3031)

Примерно такой же результат мы получили в экспериментах с мутантом по гену *DUN1* (данные не представлены), 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 рисунков 8 и 9, 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*.

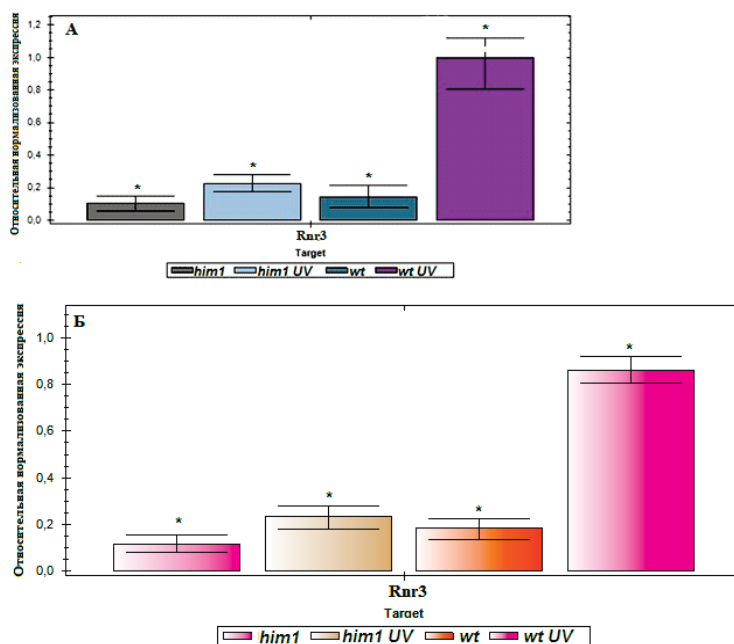


Рисунок 8. Экспрессия гена *RNR3* в штамме ДТ (11D-3031) и мутанте *him1Δ* (1-ЕАА-3031) до и после облучения УФ-светом. Доза УФ-света А) 256 Дж/м² и Б) 140 Дж/м². **p*<0.05, *t*-тест Стьюдента

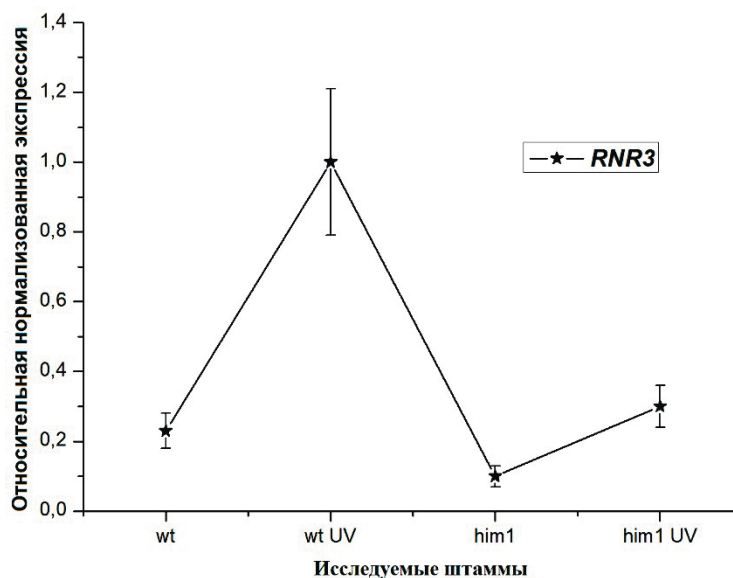


Рисунок 9. Экспрессия гена *RNR3* в штамме ДТ (11D-3031) и мутанте *him1Δ* (1-ЕАА-3031) до и после облучения УФ-светом. Доза УФ-света 140 Дж/м². На графике нанесены средние значения ± SEM, полученные в 4 независимых экспериментах

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 10 [3].

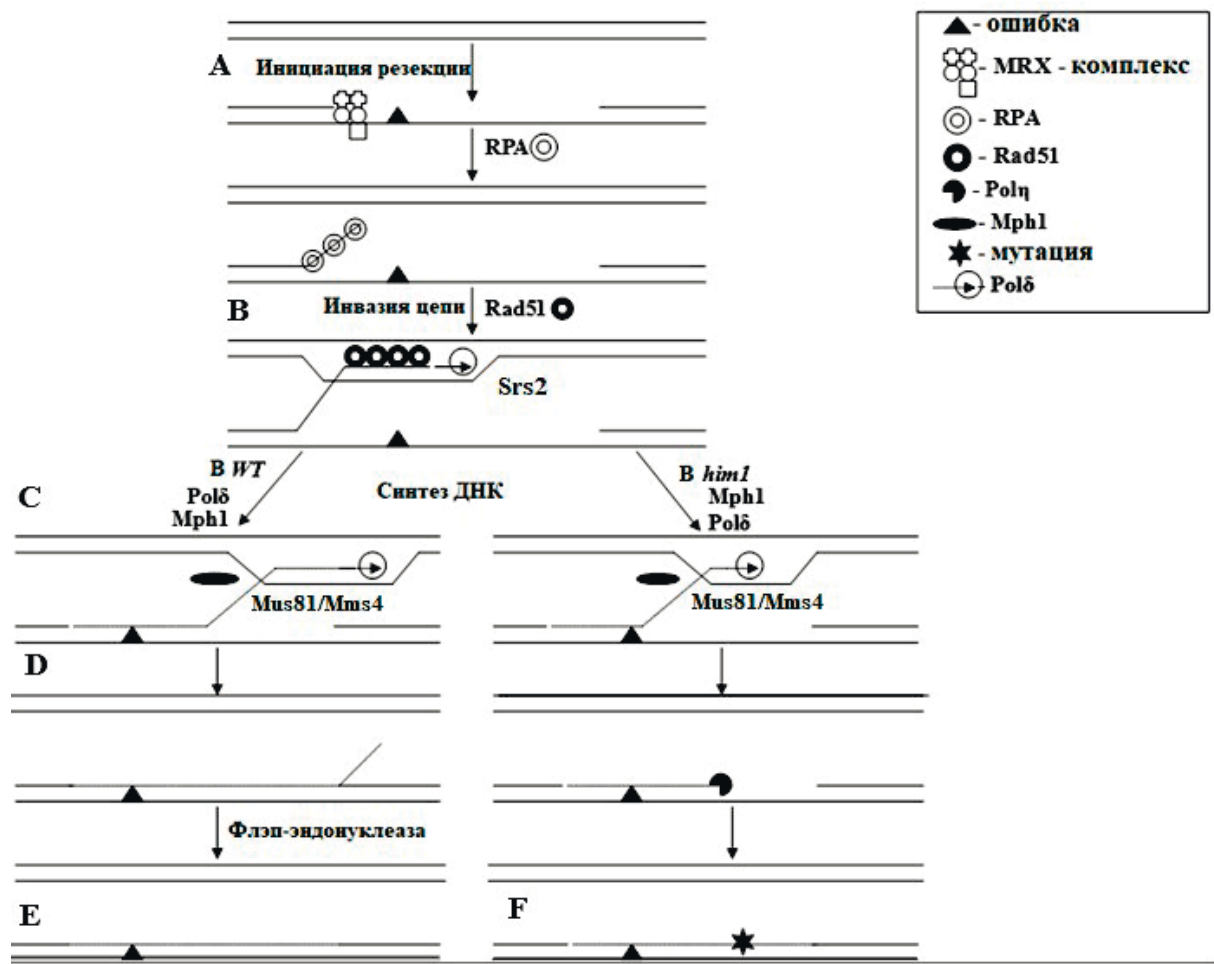


Рисунок 10. Роль гена *HIM1* в регуляции мутационного процесса у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Остановленный репликативный комплекс распознается комплексом Mre11-Rad50-Xrs2 (MRX). MRX -комплекс инициирует резекцию вновь синтезированной цепи ДНК (А). Далее происходит высвобождение 3'-конца онДНК, предположительно геликазой Pif1 и свободная онДНК связывается с RPA (А). После замены RPA на Rad51 образуется филамент оцДНК-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 Polδ на TLS ДНК-Polη (F), Polη, продолжает синтез до первой ошибки, после чего, по всей видимости, ее заменяет Polζ, 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 ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

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, **ВАК**
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, **ВАК**
3. 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, **ВАК**

СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. 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.mrfimmm.2005.03.003
2. 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
3. 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
4. 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
5. 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
6. 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
7. 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
8. 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
9. 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
10. 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
11. 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
12. 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
13. 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
14. Travesa A. Distinct phosphatases mediate the deactivation of the DNA damage checkpoint kinase Rad53 / ravesa A., Duch A., Quintana D.G. // *J. Biol. Chem*. 2008. -V.283. -P.17123–17130. doi: 10.1074/jbc.M801402200
15. Федоров Д.В. Фосфатаза РРНЗ 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