

На правах рукописи
УДК 575.1:579.852.11

Салахова Альбина Фаатовна

Характеристика новых генов *Schizosaccharomyces pombe* *dds20+* и *rpl1+*, участвующих в клеточном ответе на повреждения ДНК.

специальность 03.00.26 – «молекулярная генетика»

АВТОРЕФЕРАТ

**диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук**

Москва

2005

Работа выполнена в лаборатории молекулярной генетики репарации ДНК Института биологии гена РАН

Научные руководители: доктор биологических наук В.И. Башкиров
кандидат биологических наук Ф.К. Хасанов

Официальные оппоненты: чл.-корр. РАН, доктор биологических наук,
профессор Н.В. Томилин
доктор биологических наук, профессор Г.В. Шпаковский

Ведущая организация:

Государственный НИИ Генетики и селекции промышленных микроорганизмов

Защита диссертации состоится «24» мая 2005 года, в «11» часов на заседании диссертационного совета Д 002.037.01 в Институте биологии гена РАН по адресу: 119334, г. Москва, ул. Вавилова д.34/5.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН по адресу: 119991, г. Москва, ул. Вавилова д.32.

Автореферат разослан: «27» апреля 2005 года.

Учёный секретарь

Диссертационного совета

Кандидат фармацевтических наук

 Грабовская Л. С.

2005-4
45441

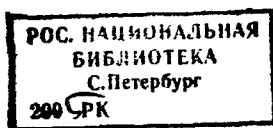
2051791

Общая характеристика работы.

Актуальность проблемы.

Целостность генетической информации клетки постоянно подвергается воздействию экзогенных химических и физических факторов, которые могут вызывать широкий спектр повреждений ДНК. Кроме того, спонтанные повреждения ДНК возникают и в процессе нормального клеточного метаболизма. Двухцепочечные разрывы ДНК, возникающие спонтанно или при действии ряда физических и химических факторов, например, таких как ионизирующая радиация и алкилирующий агент метилметансульфонат, являются наиболее тяжелыми повреждениями ДНК, препятствующими процессам транскрипции и репликации ДНК. Не репарированные или неправильно репарированные двухцепочечные разрывы ДНК могут приводить к хромосомным перестройкам, мутагенезу, канцерогенезу и клеточной смерти. Существенной потребностью всех организмов является поддержание целостности генома и противодействие накоплению повреждений ДНК. Живые организмы выработали специальные системы для исправления таких повреждений ДНК, среди которых наиболее существенными являются фотореактивация УФ повреждений, эксцизионная репарация нуклеотидов и оснований ДНК, и рекомбинационная репарация ДНК. Двухцепочечные разрывы ДНК репарируются в клетках дрожжей преимущественно с помощью системы рекомбинационной репарации. Рекомбинационная репарация представляет собой безошибочный способ исправления ошибок ДНК, поскольку она использует информацию другого гомолога или сестринской хроматиды для репарации повреждения ДНК. В клетках существуют также и другие механизмы репарации двухцепочечных разрывов ДНК, основанные на отжиге одно-цепочечных участков или негомологичном соединении концов ДНК в месте разрыва. Однако в отличие от рекомбинационной репарации два последних механизма репарации двухцепочечных разрывов ДНК являются потенциально мутагенными, поскольку они сопровождаются делециями ДНК в местах разрывов.

В ответ на повреждение ДНК происходит остановка клеточного цикла, индуцируется транскрипция репарационных генов, и включаются различные пути репарации ДНК. Эти процессы контролируются механизмами контроля клеточного цикла, которые предотвращают вхождение клетки в S-фазу или митоз, до тех пор, пока повреждение ДНК не будет репарировано. Механизмы контроля клеточного цикла



являются важнейшей частью клеточного ответа на повреждения ДНК, и обеспечивают выживание клетки и стабильность ее генома.

Так как ионизирующая радиация широко используется в качестве инструмента в медицинских диагностических целях и при терапии рака, необходимо более полное понимание клеточных ответов на возможные повреждения ДНК. Более того, радиационная устойчивость раковых клеток создает ряд проблем с противораковой терапией. Как следствие, радиационная устойчивость может вызываться повышенной репарационной способностью раковых клеток. Высокий уровень рекомбинации, наблюдаемый у людей с такими синдромами предрасположенности к раку как синдромы Блума или Вернера, вызывают геномную нестабильность в клетках пациентов. Наличие прямой связи между предрасположенностью к раковым заболеваниям молочной железы и яичников и репарационными процессами было недавно продемонстрировано обнаружением взаимодействия белков *Brcal* и *Brcs2* с ключевым рекомбинационным белком *Rad51*. Рекомбинационная репарация является эволюционно консервативным механизмом и играет определяющую роль в сохранении целостности генома и выживания клеток, как бактерий, так и человека.

Таким образом, изучение молекулярных механизмов репарации двуцепочечных разрывов ДНК является актуальной проблемой молекулярной генетики и биологии. Изучение и открытие новых генов, вовлеченных в механизмы репарации и рекомбинации ДНК, позволяет не только глубже понять эти процессы, но имеет и практическое значение для онкологии и генотерапии.

Цель работы и задачи исследования.

Основной целью диссертационной работы является выяснение молекулярных механизмов рекомбинационной репарации ДНК в эукариотах, используя делящиеся дрожжи *Schizosaccharomyces pombe* в качестве модельной системы. В задачи исследования входит изучение двух открытых нами новых генов, *dds20⁺* и *rlp1⁺*, и кодируемых ими белков генетическими и молекулярно биологическими методами.

Научная новизна и практическая ценность работы.

Были идентифицированы и изучены 2 новых гена *dds20⁺* и *rlp1⁺*, участвующих в рекомбинационной репарации ДНК в делящихся дрожжах. Ген *dds20⁺* является высококопийным супрессором чувствительности к метилметансульфонату, γ и УФ лучам,

клеток с делециями в генах *rhp55⁺* и *rhp57⁺*, гомологов *S. cerevisiae*, *RAD55* и *RAD57*. Было показано, что ген *dds20⁺* функционирует в *rhp51⁻*-зависимом механизме репарации ДНК параллельно *rhp51⁺*-зависимому пути, контролируемому Rad51 паралогами, Rhp55 и Rhp57. Белок Dds20 взаимодействует с ключевым рекомбинационным белком делящихся дрожжей Rhp51, образующим нуклеопротеиновый филамент способный к поиску гомологичной ДНК и образованию гетеродуплексной ДНК. Мутант *dds20Δ* проявляет холодочувствительность в репарации УФ и MMC – индуцированных повреждений ДНК, предполагая, что он участвует в сборке или стабилизации мультипротеинового комплекса. Эпистатический анализ показывает, что белок Dds20 функционирует в Cds1-независимом пути толерантности к повреждениям ДНК, вызванным действием УФ света. Обнаружен новый тип белковых повторов (повторы PDA), который предположительно является структурным модулем, опосредующим взаимодействие между белками Dds20 и Rhp51. Показано, что введение замен консервативных аминокислотных остатков PDA повторов с помощью сайт-направленного мутагенеза нарушает репарационную функцию белка Dds20. Таким образом, впервые обнаружен новый функциональный модуль в белке, участвующий в репарации двуцепочечных разрывов ДНК.

Новый репарационный ген *S. pombe rlp1⁺* принадлежит к семейству RecA подобных генов. Эпистатический анализ показывает, что *rlp1⁺*, вместе с генами *rhp51⁺*, *rhp54⁺* и *rhp55⁺* является членом одной и той же группы генов, контролирующих механизм рекомбинационной репарации. Кодированный геном *rlp1⁺* белок Rlp1 показывает высокую степень гомологии с белками *E. coli* RecA, *S. pombe* Rhp51, а также с белком человека Xrcc2. Rlp1 является новым Rad51 паралогом делящихся дрожжей наряду с Rhp55 и Rhp57 и выполняет, по-видимому, специализированную функцию в полимеризации белка Rhp51 на ДНК. Обнаружение гена *rlp1⁺*, гомолога гена человека XRCC2 в *S. pombe*, и его изучение продемонстрировало функциональное разнообразие и специализацию RecA-подобных белков в ряду от почкующихся дрожжей до позвоночных.

Представленная работа направлена на решение фундаментальной задачи – понимание механизмов рекомбинационной репарации в эукариотических организмах. Проведенные исследования могут также послужить основой для изучения этих механизмов в клетках человека с выходом на заболевания, связанные с нарушением стабильности генома, в частности рака. Они также важны и для понимания процессов гомологичной рекомбинации при генных манипуляциях с клетками высших организмов (трансгенезис и генотерапия).

Апробация работы.

Материалы диссертации были доложены на конференциях "Molecular Genetics of Eukaryotes" (Москва, 4.02.-7.02. 2003), "FASEB Meeting. Genetic Recombination & Genome Rearrangement" (Snowmass Village, Snowmass, Colorado, USA, 26.07-31.07, 2004), "Scientific Meetings of HHMI Research Scholars" (20.06-23.06, 2001, Vancouver, Canada; 23.06-26.06, 2004, Tallinn, Estonia)

Структура и объем диссертации.

Диссертация состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты исследования, обсуждение результатов, выводы, список литературы. Работа изложена на 126 страницах машинописного текста и содержит 12 таблиц и 21 рисунок. Библиография включает 129 источников

Содержание работы

Dds20 – высоко-копийный супрессор нарушения репарации клеток, лишенных *S. pombe* Rad51 паралогов, Rhp55 и Rhp57.

Для того чтобы идентифицировать новые гены, участвующие в рекомбинационной репарации, мы провели скрининг геномной библиотеки *S. pombe* на плазмиде pUR19 на предмет обнаружения высококопийных супрессоров ММС-чувствительности клеток с делецией гена *S. pombe rhp55⁺*. В результате скрининга были выявлены несколько фрагментов геномной ДНК, супрессирующих ММС чувствительный фенотип мутантных клеток *rhp55*. Среди них наиболее сильной супрессорной активностью обладала вставка ДНК размером 3.4 т.п.н. Рестрикционный анализ позволил идентифицировать минимальный участок ДНК (*KpnI* фрагмент ДНК размером 1475 п.н.), обладающий супрессорной активностью. Секвенирование *KpnI* фрагмента ДНК выявило потенциальную рамку считывания, кодирующую белок размером 299 аминокислот. Новый ген был назван *dds20⁺* (DNA damage sensitive isolate 20). Клонирование и секвенирование кДНК *dds20⁺* подтвердило, что ген не имеет интронов (номер поступления в GenBank: AY275538). Клонирование кДНК привело также к обнаружению антисмысловой РНК, транскрибируемой в противоположном направлении и перекрывающейся с мРНК *dds20⁺*. Эта РНК (номер поступления в GenBank AY738531) имеет два интрона. Для того чтобы убедиться, что за супрессорную активность отвечает рамка считывания гена *dds20⁺*, а не

противоположно транскрибируемая РНК, мы ввели мутацию сдвига рамки считывания в *dds20⁺*, разрезав вставку с помощью *XhoI* и заполнив липкие концы с помощью фрагмента Кленова перед лигированием. Эта мутация полностью убирала эффект супрессии *KpnI* фрагмента ДНК (Рис.1).

Поиск с помощью программы BLAST не выявил значимых гомологов *Dds20* в открытых базах данных за исключением С-концевой части *S. pombe* *Swi2*, участвующего в переключении типа спаривания и белка CNBF2390 *Cryptococcus neoformans* неизвестной функции С-концевые части белков *Dds20* и *Swi2* имеют 24% идентичности аминокислотной последовательности. Анализ аминокислотной последовательности *Dds20* выявил наличие сверхспирального домена (аминокислоты 178-236), предсказанного с большой долей вероятности программой COILS. Не было обнаружено никаких других известных мотивов в *Dds20* при использовании баз данных белковых мотивов и доменов

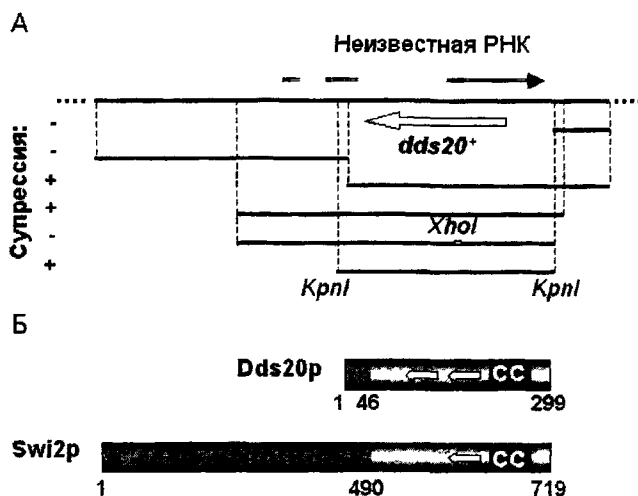


Рис 1 Клонирование гена *dds20⁺* и предполагаемая его белковая структура (А) Схема делеционного анализа клонированного геномного фрагмента ДНК с целью определения минимальной области ДНК, отвечающей за супрессорный эффект. Идентификация открытой рамки считывания *dds20⁺* как одного из двух противоположно направленных транскриптов (объяснение в тексте). (Б). Структура домена белка *Dds20* и его связь с белком *S pombe* *Swi2*. Серым цветом помечена область гомологии между двумя белками. Черным цветом – coiled-coil домен (CC). Стрелками помечены PDA повторы.

KpnI фрагмент геномной ДНК с *dds20⁺* на высококопийном векторе pUR19 частично супрессировал чувствительность мутанта *rhp55Δ* к MMC и γ лучам (Рис.2А, Б), но не наоборот. Ген *rhp55⁺* не был способен супрессировать чувствительность клеток *dds20Δ* к MMC (Рис.3Д). Однако высококопийность *dds20⁺* не могла супрессировать репарационные

дефекты делеций *rhp51⁺* и *rhp54⁺*, других ключевых игроков рекомбинационной репарации (Рис.2В). Так как белок Rhp55 образует стабильный гетеродимер с Rhp57, была также проверена супрессия мутанта *rhp57Δ*. Как и ожидалось, чувствительность мутанта *rhp57Δ* к MMC супрессировалась многокопийностью *dds20⁺*. Основываясь на этих данных, был сделан вывод, что *dds20⁺* специфически супрессирует нарушения репарации ДНК у клеток, в которых отсутствуют Rad51 паралоги.

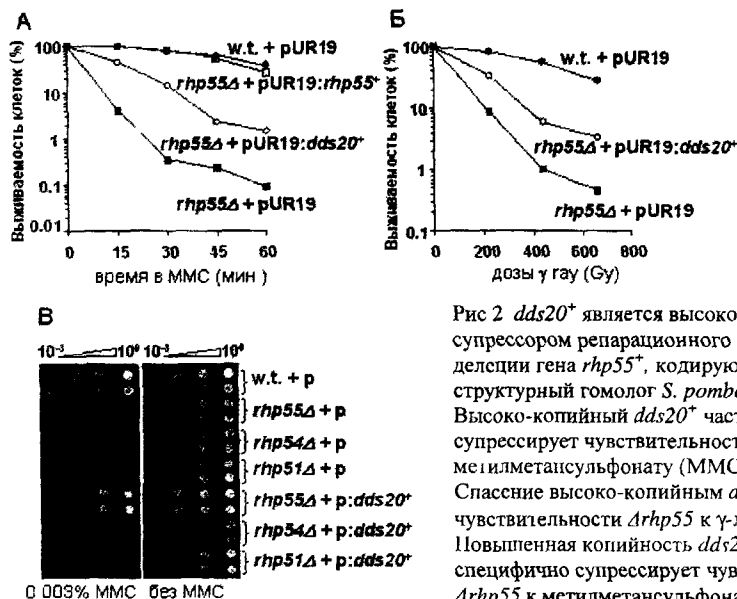


Рис 2 *dds20⁺* является высоко-копийным супрессором репарационного дефекта делеции гена *rhp55⁺*, кодирующего структурный гомолог *S. pombe* Rad51 (А) Высоко-копийный *dds20⁺* частично супрессирует чувствительность *Δrhp55* к метилметансульфонату (MMC) (Б) Спасение высоко-копийным *dds20⁺* чувствительности *Δrhp55* к γ-лучам, (В) Повышенная копия *dds20⁺* специфично супрессирует чувствительность *Δrhp55* к метилметансульфонату

Чувствительность мутантных клеток *dds20Δ* к генотоксическому стрессу.

Наши эксперименты показали, что делеция гена *dds20⁺* приводит к чувствительности клеток к алкилирующему агенту MMC (Рис.3А, Б, В и Г). Более ранние исследования показали, что в *S. pombe* гомологи генов RAD52 группы *S. cerevisiae*, *rhp50⁺*, *rhp51⁺*, *rhp54⁺*, *rhp55⁺*, *rhp57⁺*, *rad22⁺* и *rlp1⁺*, представляют собой одну эпистатическую группу, участвующую в рекомбинационной репарации ДНК. Для выяснения роли белка Dds20 в репарации ДНК мы провели анализ эпистатических взаимодействий *dds20Δ* с представителями RAD52 группы (Рис.3 и 4). Мы обнаружили, что мутант *dds20Δ* показывает синергизм и аддитивность при репарации повреждений, индуцируемых MMC и

γ – лучами, с мутантами *rhp55Δ* и *rlp1Δ*, соответственно, так как двойные мутанты были более чувствительны, чем наиболее чувствительный одиночный мутант. Синергизм в увеличении чувствительности двойных мутантов свидетельствует, что гены работают в разных путях. Таким образом, ген *dds20⁺* участвует в другом пути репарации, чем Rad51 паралоги, *rhp55⁺* и *rlp1⁺*. Однако, *dds20Δ* показал эпистаз с мутантами *rhp51Δ* и *rhp54Δ* – двойные мутанты были так же чувствительны к ММС (Рис.3Г) и γ лучам (Рис 4б) как наиболее чувствительные одиночные мутанты (*rhp51Δ* и *rhp54Δ*). Более того, двойной мутант *dds20Δrhp55Δ* оказался так же чувствителен к ММС, как и одиночный мутант *rhp51Δ* (Рис.3Б). Эти данные указывают на то, что Dds20 является новым белковым фактором, вовлеченным в Rhp51/Rhp54-зависимый путь репарации ДНК.

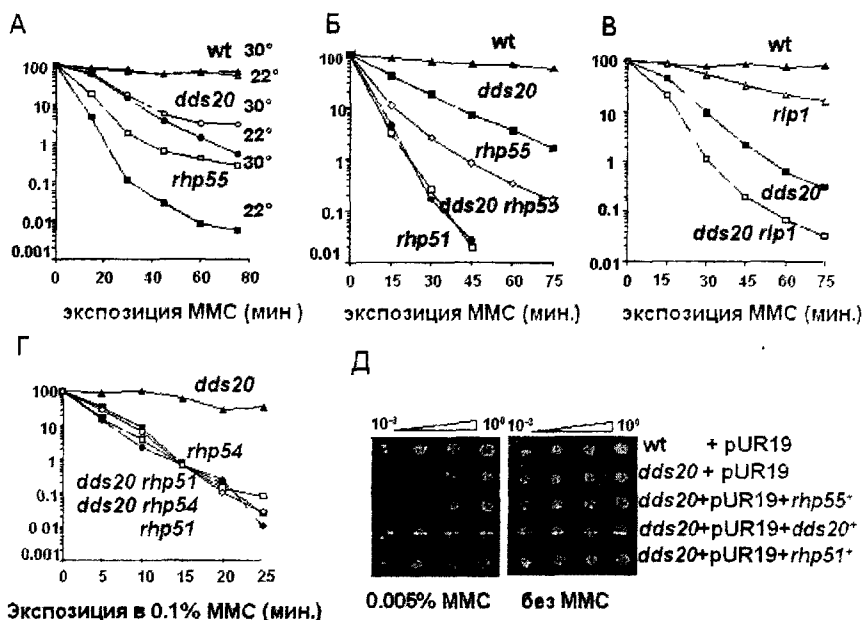


Рис 3 Холодо-чувствительность и эпистатический анализ мутанта *dds20Δ* в репарации индуцированных ММС повреждений ДНК (А) Мутант *dds20* показал повышенную чувствительность к ММС при пониженной температуре (Б) обнаружен синергизм между *dds20* и *rhp55* в репарации повреждений ДНК, индуцированных ММС (В) *dds20* и *rlp1* дополнительно повышают чувствительность клеток к ММС (Г) *dds20* эпистатичен *rhp51* и *rhp54* (Д) *rhp51⁺* является высоко коопийным супрессором чувствительности *dds20* к ММС

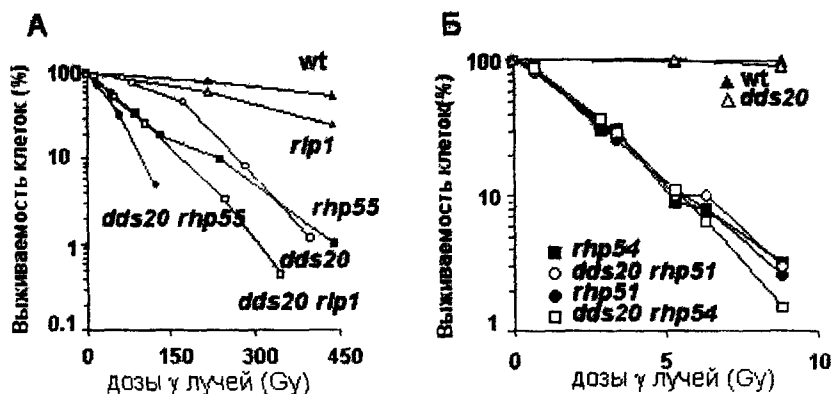


Рис.4. Эпистатический анализ на чувствительность к ионизирующей радиации. (А) Эпистатический анализ с мутантами *dds20*, *rhp55* и *rlp1*; (Б) Выживаемость двойных мутантов *rhp51dds20* и *rhp54dds20* при облучении клеток разными дозами γ -лучей.

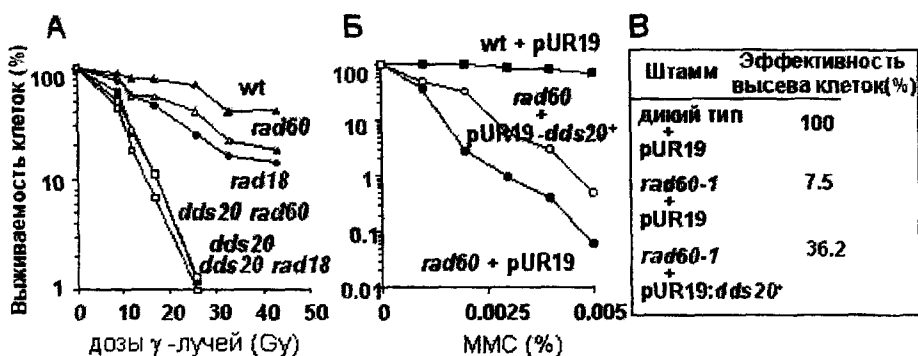


Рис 5. *dds20* эпистатичен *rad60* и *rad18* в экспериментах по клеточной выживаемости при воздействии γ -лучей и MMC, а также супрессирует мутацию *rad60-1* в опытах по высеву клеток (А) Кривые выживаемости при обработке γ -лучами одиночных и двойных мутантов *dds20*Δ, *rad60-1*, *rad18-na74*. (Б) Повышенная копия *dds20* частично супрессирует MMC чувствительность мутанта *rad60-1*. (В) Повышенная экспрессия *dds20* частично супрессировала пониженную выживаемость гипоморфного мутанта *rad60*

Так как *dds20*⁺ эпистатичен *rhp51*⁺ и *rhp54*⁺, но не *rhp55*⁺ и *rlp1*⁺, эти результаты могут быть наиболее просто интерпретированы, если принять, что белок Dds20 действует в Rhp51-зависимом пути параллельном пути, контролируемым Rad51 паралогами, белками

Rhp55, Rhp57 и Rlp1. Таким образом, Dds20 является новым белком, который участвует в механизме рекомбинационной репарации ДНК, и функционирует параллельно Rad51 паралограм, Rhp55, Rhp57 и Rlp1 (Рис.6).

***dds20* эпистатичен *rad18* и *rad60* и является высококопийным супрессором репликационных и репарационных дефектов мутанта *rad60*.**

В клеточном ответе на облучение ионизирующей радиацией SMC белок *S. pombe* Rad18 и белок Rad60 функционируют в том же репарационном пути, что и Rhp51. Гены *rad18⁺* и *rad60⁺* являются существенными генами, и, как было показано, участвуют в репарации двуцепочечных разрывов ДНК, возникающих при репликации. Мы проанализировали эпистатические взаимодействия между генами *dds20⁺*, *rad60⁺* и *rad18⁺* в репарации повреждений, вызванных действием гамма лучей (Рис.5 А). Для проведения этого анализа предварительно были сконструированы двойные мутанты *dds20Δrad60-1* и *dds20Δrad18-na74*. Двойные мутанты *dds20Δrad18-na74* и *dds20Δrad60-1* оказались не чувствительнее одиночного мутанта *dds20Δ*. Таким образом, все три гена (*dds20⁺*, *rad60⁺* и *rad18⁺*), принадлежат к одной эпистатической группе и функционируют одним и тем же путем репарации двуцепочечных разрывов ДНК. Была проверена и возможность супрессии репарационного дефекта мутантов *rad60-1* и *rad18-na74* при сверхэкспрессии Dds20. Оказалось, что *dds20⁺* в большом числе копий частично супрессирует гиперчувствительность мутанта *rad60-1* к MMC (Рис. 5Б), также как и его низкую эффективность посева при 30° (Рис. 5В). Однако не наблюдалось супрессии гиперчувствительности к MMC у мутанта *rad18-na74* (данные не показаны). Поскольку белки Rad60 и Rad18 взаимодействуют между собой и имеют частично перекрывающиеся функции в репарации двуцепочечных разрывов ДНК, то, по-видимому, повышенная экспрессия белка Dds20 супрессирует Rad18-независимую функцию белка Rad60.

Dds20 участвует в Cds1-независимом механизме толерантности УФ повреждений ДНК.

Пиримидиновые димеры и пиримидин 6-4 фотопродукты являются основными повреждениями ДНК, возникающими при действии УФ света, и потенциально могут приводить к остановке движения репликационных вилок. В клетках *S. pombe* используются два механизма репарации УФ повреждений: нуклеотидная эксцизионная репарация (НЭР) и эксцизионная репарация УФ повреждений (UVDE).

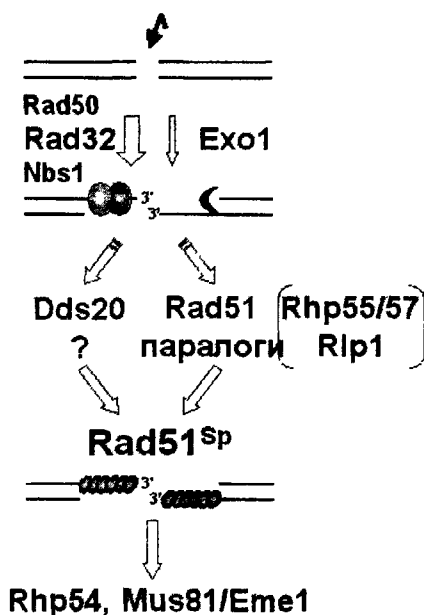


Рис.6. Путь рекомбинационной репарации в *S. pombe*. После формирования двуцепочечных разрывов концы ДНК процессируются нуклеазами, комплексом Rad50/Rad32/Nbs1 или Exo1. Rad51^{Sp} нуклеопротеиновый филамент образуется на 3'-выступающих концах одно-цепочечной ДНК при замещении конкурирующего белка RPA через использование двух параллельных механизмов, с участием Rad51 паралога и участием белка Dds20. Инвазия цепи инициируется Rad51^{Sp} филаментом и продолжается с участием Rhp54 и Mus81/Eme1, завершая процесс репарации двуцепочечных разрывов ДНК.

Гены рекомбинационной репарации важны как для клеточной выживаемости при УФ повреждениях ДНК (механизм UVDE), так и для механизма толерантности к УФ повреждениям ДНК, контролируемого чекпойнт киназой Cds1. Механизм толерантности к УФ повреждениям ДНК, по-видимому, восстанавливает движение репликационной вилки с помощью рекомбинационного механизма. Мутанты *S. pombe* по генам репарации ДНК показывают значительную гиперчувствительность к УФ свету. Мы обнаружили, что мутант *dds20* является гиперчувствительным к УФ, и его чувствительность повышается при снижении температуры инкубации клеток (Рис.7А). Сходная картина наблюдалась и при использовании MMC (Рис.3А). Это предполагает, что Dds20 возможно является фактором нуклеации или стабилизации мультипротеинового комплекса, участвующего в клеточном ответе на повреждения ДНК, вызванные УФ светом. Эпистатический анализ показывает, что *dds20*⁺ не вовлечен ни в НЭР, ни в UVDE репарацию, поскольку двойные мутанты *dds20rad13* и *dds20uve1* более чувствительны, чем одиночные (Рис.7Б). Ген *rad13*⁺ кодирует в клетках *S. pombe* гомолог эндонуклеазы XPG человека, а ген *uve1*⁺ кодирует УФ эндонуклеазу. Как и при использовании MMC, двойной мутант *dds20rhp55* показал

синергизм при сравнении с чувствительностью одиночных мутантов (Рис.7Б). Однако чувствительность двойных мутантов *dds20rhp51* и *dds20rhp54* указывает, что эти гены являются эпистатическими по отношению друг к другу (Рис.7В).

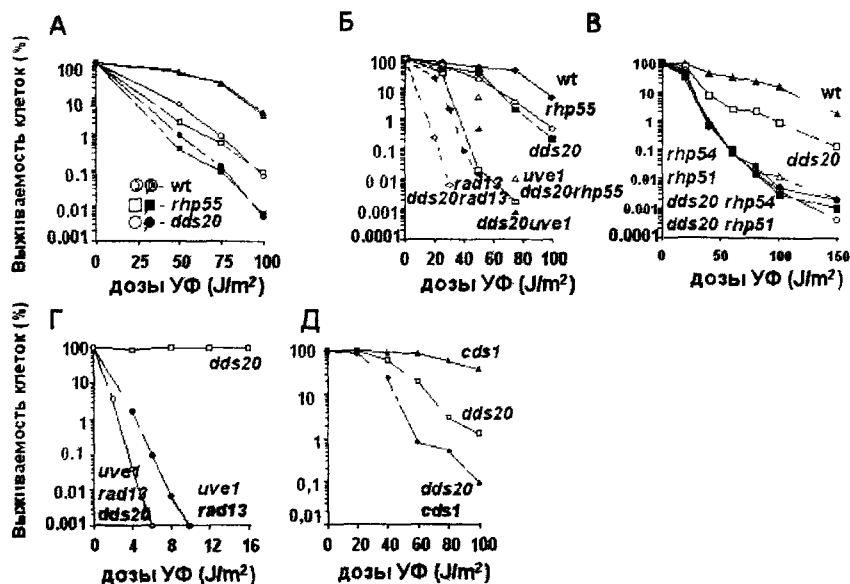


Рис 7 Анализ ответа клеток мутанта *dds20Δ* на повреждения ДНК, вызванные действием УФ лучей. (А) Холодочувствительность мутанта *dds20Δ* к УФ свету. (Б) и (Г) Эпистатический анализ между *dds20Δ* и делеционными мутантами по генам *S pombe*, участвующим в нуклеотидной эксцизионной репарации и UVER репарации повреждений, вызванных действием УФ лучей. (В) Эпистатический анализ между *dds20Δ* и делециями генов рекомбинационной репарации, *rhp51⁺* и *rhp54⁺* (Д) Эпистатический анализ между *dds20Δ* и делецией гена *cds1*. Все кривые выживаемости были определены при 30°C, за исключением (А), где были использованы температуры 22°C и 30°C.

Это предполагает, что, как и в случае с ответом на повреждения ДНК, индуцированные ММС и γ лучами, Dds20 оперирует в Rad51-зависимом механизме репарации УФ повреждений, параллельном пути, контролируемом белком Rhp55. В случае, когда оба механизма репарации (НЭР и UVDE) были инактивированы в мутанте *rad13uve1*, добавление мутации *dds20Δ* значительно повышало чувствительность к УФ свету клеток *rad13uve1* (Рис.7Г). Это указывает на то, что *dds20⁺* участвует в механизме толерантности к УФ повреждениям ДНК, позволяющем поврежденной ДНК реплицироваться в отсутствии НЭР и UVDE. Ранее было установлено существование механизма

толерантности к УФ повреждениям ДНК, который включает ряд генов группы рекомбинационной репарации (*rhp51⁺*, *rhp54⁺*, *mus81⁺* и *rad18⁺*) и контролируется киназой Cds1, играющей роль в чекпойнте S фазы. Так как *dds20⁺* является эпистатичным геном *rhp51⁺* и *rhp54⁺*, мы проверили, показывают ли *dds20* и *cds1* эпистаз по отношению друг к другу. Как показано на Рис.7Д, двойной мутант *dds20cds1* был более чувствительным, чем любой из одиночных мутантов по этим генам. Таким образом, *dds20⁺* действует в чекпойнт – независимом рекомбинационном механизме толерантности к УФ повреждениям ДНК. Этот вывод дополнительно подтверждается фактом существования двух субпути рекомбинационной репарации повреждений ДНК, вызываемых ионизирующей радиацией и MMC, так и обнаружением нами синергизмом между *dds20⁺* и *chk1⁺* или *rad3⁺*, другими ключевыми генами, кодирующими чекпойнт киназы (данные не приводятся)

Уровень потери хромосомы и митотической рекомбинации не изменен в мутанте *dds20*.

Репарационные мутанты *rhp51* и *rhp54* обладают повышенной частотой потери минихромосом. Поэтому мы определили частоты потери хромосомы и гомологичной рекомбинации у мутанта *dds20*, в сравнении с клетками дикого типа и мутанта *rhp55*. Как показано в Табл 1 у мутанта *dds20* мы наблюдали частоту потери хромосом на уровне клеток дикого типа, тогда как у мутанта *rhp55* потеря хромосомы в течение каждого клеточного деления была приблизительно в 2000 раз чаще, чем у клеток дикого типа. Мы не обнаружили дефекта в митотическом кроссинговере в клетках *dds20*: небольшое уменьшение по сравнению с клетками дикого типа было статистически не значимым (Табл 2). Клетки мутанта *rhp55* показали гипер-рекомбинационный фенотип, проявляющийся в 11-кратном повышении уровня митотического кроссинговера. Чтобы измерить частоту рекомбинации между сестринскими хроматидами в мутанте *dds20* мы использовали гаплоидный штамм с маркером *ura⁺*, фланкированным прямыми повторами гетероаллелей *ade6* (*ade6-469* и *ade6-M375*). Образование *ade⁺* рекомбинантов является результатом гомологичной рекомбинации между *ade⁻* аллелями одной хроматиды (внутри-хроматидная рекомбинация) или между аллелями сестринских хроматид (рекомбинация сестринских хроматид). Мы обнаружили, что частота рекомбинации сестринских хроматид на 1×10^6 высевных клеток увеличивалась в 1.2-раза в мутанте *dds20* при сравнении со штаммом дикого типа (Табл.3), что соответствует 1.2-кратному увеличению частоты рекомбинации при вычислении методом медианы Ли-Коулсон (Lea-Coulson). Однако

статистический анализ с использованием U-теста Манна-Уитни (Mann-Whitney) показал, что это увеличение является статистически не значимым. И, наоборот, у мутанта *rhp55* частота рекомбинации между сестринскими хроматидами была увеличена в 4.1-раза, что соответствовало 3.2-кратному увеличению степени рекомбинации. Полученные данные показывают, что *dds20⁺* не имеет видимой роли в гомологичной рекомбинации сестринских хроматид в вегетативных клетках.

Таблица 1. Частота потери 3-й хромосомы в диплоидах *dds20Δ* и *rhp55Δ*

Среднее кол-во гаплоидов на 1×10^6 высевных клеток ^a			Частота гаплоидизации на деление ^b		
Дикий тип	<i>dds20Δ</i>	<i>rhp55Δ</i>	Дикий тип	<i>dds20Δ</i>	<i>rhp55Δ</i>
0.27×10^2	0.3×10^2 ($1.1 \times^c$) $P \geq 0.05^d$	1.1×10^5 ($4140 \times^c$) $P < 0.001^d$	4.34×10^{-6}	4.9×10^{-6} ($1.1 \times^c$)	1.0×10^{-2} ($2300 \times^c$)

Таблица 2. Частота кроссинговера между гомологами (между центромерой и локусом *ura4* на 3-й хромосоме в диплоидах *dds20Δ* и *rhp55Δ*)

Среднее кол-во рекомбинангов на 1×10^6 высевных клеток ^a			Частота рекомбинации между гомологами на деление ^b		
Дикий тип	<i>dds20Δ</i>	<i>rhp55Δ</i>	Дикий тип	<i>dds20Δ</i>	<i>rhp55Δ</i>
0.8×10^3	0.6×10^3 ($0.75 \times^c$) $P \geq 0.05^d$	1.4×10^4 ($17 \times^c$) $P < 0.001^d$	7.95×10^{-5}	6.15×10^{-5} ($0.77 \times^c$)	8.68×10^{-4} ($11 \times^c$)

Таблица 3. Частота рекомбинации между сестринскими хроматидами в клетках дикого типа, *dds20Δ* и *rhp55Δ*

Среднее кол-во <i>ade⁺</i> рекомбинантов на 1×10^6 высевных клеток ^a			Частота меж/внутри-сестринской рекомбинации на деление ^b		
Дикий тип	<i>dds20Δ</i>	<i>rhp55Δ</i>	Дикий тип	<i>dds20Δ</i>	<i>rhp55Δ</i>
4.4×10^4	5.4×10^4 ($1.2 \times^c$) $P \geq 0.05^d$	18.2×10^4 ($4.1 \times^c$) $P < 0.001^d$	3.25×10^{-3} ($1.2 \times^c$)	3.86×10^{-3} ($3.2 \times^c$)	10.5×10^{-3}

^aВычислено на основе 20 независимых экспериментов

^bВычислено с помощью метода медианы Ли-Коулсона

^cКоэффициент увеличения в сравнении с диким типом

^dВероятность, вычисленная с помощью U-теста Манн-Уитни

Мейотическая рекомбинация снижена в мутанте *dds20Δ*.

Делеции в генах *rhp51⁺*, *rhp54⁺*, *rhp55⁺* и *rad22⁺*, принадлежащих к группе *S. pombe* RAD52, приводят к нарушениям различной степени в мейозе и мейотической рекомбинации. Мы проверили мутант *dds20Δ* на мейоз - специфичные фенотипы. Оказалось, что жизнеспособность спор при скрещивании штаммов *dds20Δ* была сравнимой со скрещиванием клеток штаммов дикого типа, 88% и 92%, соответственно. Мы также наблюдали небольшое различие в эффективности споруляции: 32% в диком типе и 25% в мутанте *dds20*. Чтобы определить в какой степени мутация *dds20Δ* влияет на рекомбинацию, мы определили частоту мейотической внутри- и межгенной рекомбинации (см. Таблицы 4 и 5). Наблюдалось 5-20 кратное уменьшение частоты внутригенной рекомбинации в зависимости от тестируемых интервалов (Табл.4). Межгенную рекомбинацию (Табл.5) анализировали в двух интервалах: *his1-lys7* (хромосома I) и *ade1-lys4* (хромосома II), и было обнаружено, что она уменьшалась в клетках мутанта приблизительно в 11 и 13-раз, соответственно. Полученные результаты позволяют заключить, что функция белка Dds20 необходима для мейотической рекомбинации в делящихся дрожжах.

Мы обнаружили, что повышенная экспрессия *dds20⁺* на плазмидном векторе pUR19 почти полностью супрессирует снижение эффективности споруляции и частично в жизнеспособности спор мутанта *rhp55*. При этом снижение внутригенной (в скрещиваниях *ade7-50* x *ade7-152* и *ade6-469* x *ade6-M375*) и межгенной (в интервале *lys4-ade1*) рекомбинации у мутанта *rhp55Δ* не восстанавливается. Основываясь на этих данных можно предположить, что *rhp55⁺* и *dds20⁺* обладают уникальными функциями в мейотической рекомбинации. Снижение жизнеспособности спор штамма с мутацией *rhp55Δ* вызвано ее влиянием на предмейотическую (проблемы с репликацией ДНК, выраженные элонгацией клеток и ядерными абберациями) и мейотическую (рекомбинационная и хромосомная сегрегация) стадии. Вероятно, способность гена *dds20⁺* при повышенной экспрессии частично супрессировать жизнеспособность спор клеток с мутацией *rhp55Δ*, обусловлена супрессией лишь их митотического дефекта. В действительности, и оказалось, что повышенная экспрессия *dds20⁺* частично супрессирует

фенотип клеточной элонгации штамма *rhp55Δ* в вегетативно делящихся клетках (данные не показаны).

Таблица 4. Мейотическая внутригенная рекомбинация в мутантах *dds20*

		Прототрофы/10 ⁶ жизнеспособных спор		Коэффициент уменьшения
Хромосомы и аллели		Дикий тип	<i>dds20Δ</i>	
II L	<i>ade7-150 x ade7-152</i>	420 ± 85	21 ± 5	20 0
III R	<i>ade6-469 x ade6-M375</i>	635 ± 17	68 ± 7	9.3
III R	<i>ade6-469 x ade6-M26</i>	10852 ± 42	2080 ± 389	5 2

Таблица 5. Мейотическая межгенная рекомбинация в мутантах *dds20*

		Рекомбинанты (%)		Коэффициент уменьшения
Хромосома и интервал		Дикий тип	<i>dds20Δ</i>	
I R	<i>his1-lys7</i>	26.7 ± 2.4	2.4 ± 0.3	11.1
II R	<i>ade1-lys4</i>	28.7 ± 1.7	2.2 ± 0.2	12.9

Dds20 является ядерным белком, взаимодействующим с Rhp51 (Rad51).

Чтобы изучить клеточную локализацию белка Dds20, мы сконструировали слитой ген *dds20⁺* с *Myc13*. Был использован метод иммуофлуоресценции на мейотических делящихся клетках с применением антител к *Myc*. Следует отметить, что клетки *dds20⁺* - *Myc13* экспрессировали функциональный белок, поскольку устойчивость таких клеток к ММС и УФ была одинаковой со штаммом дикого типа. Флуоресцентный сигнал был обнаружен в клеточном ядре и локализовался на DAPI окрашенной хромосомной ДНК. Анализ видео изображений показал, что примерно 30-50 фокусов белка Dds20-Myc13 приходилось на одно ядро. Эти результаты указывают, что Dds20 является ядерным белком с дискретной локализацией. Известно, что некоторые эукариотические белки участвующие в репарации ДЦР, формируют ядерные фокусы, особенно после обработки ДНК повреждающими агентами.

Так как Dds20 функционирует в Rhp51-зависимом пути репарации ДЦР ДНК, мы провели дрожжевой количественный двугибридный анализ на предмет того, взаимодействует ли Dds20 с другими белками рекомбинационной репарации. Эти результаты, представленные в Таблице 8, показывают, что Dds20 сильно взаимодействует с полноразмерным белком Rhp51.

Таблица 6. Дрожжевой двугибридный анализ с белком Dds20

DBD	AD	β -Gal активность	Козф. увеличения
Dds20	-	4.8	1.0
	Rhp51	2143.7	448.5
Rhp51	-	2.9	1.0
	Dds20	3.8	1.3

Не было обнаружено сколько-либо существенных взаимодействий с другими членами RAD52 группы, Rhp54, Rhp55, Rhp57 и Rad22, а также с мейотическим гомологом Rhp51, белком Dmc1.

Для подтверждения наших данных по взаимодействию Dds20 и Rhp51 в дрожжевом двугибридном анализе, мы провели эксперименты по иммунопреципитации этих белков. Плазмида сверхэкспрессирующая слитой белок GST-Rhp51 под контролем *nmt* промотора, была введена в штаммы *dds20⁺-myc13* и *dds20*. Белок Dds20-Myc13 иммунопреципитировали с помощью антител против Мус и белок G Сефарозы. Как показано на Рис.8 (дорожка 2) белок GST-Rhp51 преципитировался вместе с Myc13-слитым Dds20. Контроли в иммунопреципитационных экспериментах показали специфичность использованных антител (дорожка 3) и что белок GST-Rhp51 не связывался не специфически с шариками протеин G сефарозы (дорожка 1). Таким образом, наши данные указывают на взаимодействие между белками Dds20 и Rhp51 *in vivo*.

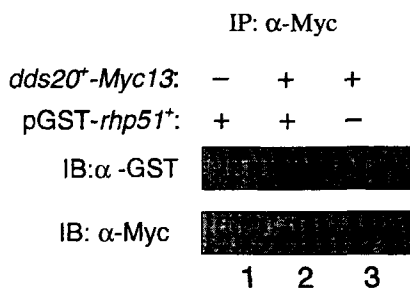


Рис.8. Белок Dds20 взаимодействует с Rhp51 *in vivo*.

Повторы PDA необходимы для функции белка Dds20.

Присутствие PDA повторов в белке Dds20 предполагает, что они могут иметь функциональное значение. Чтобы выяснить это, мы проверили, может ли повышенная

экспрессия PDA повторов вызывать доминантно негативный эффект на клеточную выживаемость в условиях генотоксического стресса. Мы экспрессировали часть белка Dds20 (остатки аминокислот 71-176), содержащую повторы PDA1 и PDA2, в штамме дикого типа и провели «капля-тест» на среде с MMC и без него. Как показано на Рис 9А, повышенная экспрессия PDA повторов (- thi) вызывает умеренно негативный эффект на клеточную выживаемость (ряд 1 и 3). Это особенно было заметно на чашках с MMC в сравнении с клетками, у которых экспрессия белка была репрессирована (ряд 2 и 4), или с клетками, содержащими пустой вектор (ряд 5, 6, 7, и 8). Это может предполагать, что PDA повторы являются модулями, определяющими взаимодействие между белками, и когда они экспрессируются в большем числе копий, то могут оттитровать белок, с которым взаимодействует Dds20 в клетке и/или приводить к стехиометрическому дисбалансу компонентов мультипротеинового комплекса. Так как белок Dds20 взаимодействует с белком Rhp51, мы задались вопросом является ли негативный эффект повышенной экспрессии PDA повторов зависимым от присутствия в клетке белка Rhp51. Тот же эксперимент был выполнен на клетках не имеющих белка Rhp51 (штамм *rhp51Δ*), и было обнаружено, что негативный эффект повышенной экспрессии PDA повторов исчезал в отсутствии белка Rhp51 (сравните ряды 1 и 3 с 2 и 4) (Рис.9А). Это предполагает, что PDA повторы могут быть вовлечены во взаимодействие белков Dds20 и Rhp51. Чтобы выяснить функцию PDA повторов, мы ввели с помощью сайт - направленного мутагенеза аминокислотные замены в повторы PDA1 и PDA2, приводящие к изменению аминокислотного заряда на противоположный. Если PDA повторы являются модулями, определяющими взаимодействие между белками, то замена заряда на ему противоположный потенциально может приводить к потере функции повторов. Так, с помощью сайт - направленного мутагенеза были внесены аминокислотные замещения лизина на глутамат в положениях K108E (в повторе PDA1) и K164E (в повторе PDA2). Как показано на Рис 9Б, одиночная мутация в любом из повторов не приводит к чувствительности клеток к высоким дозам камптотецина (ингибитор топоизомеразы I), и только немного повышает чувствительность к MMC, тогда как делеционный мутант *dds20Δ* является очень чувствительным к этим дозам агента. Однако когда две мутации в обоих повторах были скомбинированы вместе (*dds20K108E, K164E*), клетки становились значительно чувствительнее как к MMC, так и к камптотецину, хотя и не достигали чувствительности делеционного мутанта *dds20Δ* (Рис.9Б).

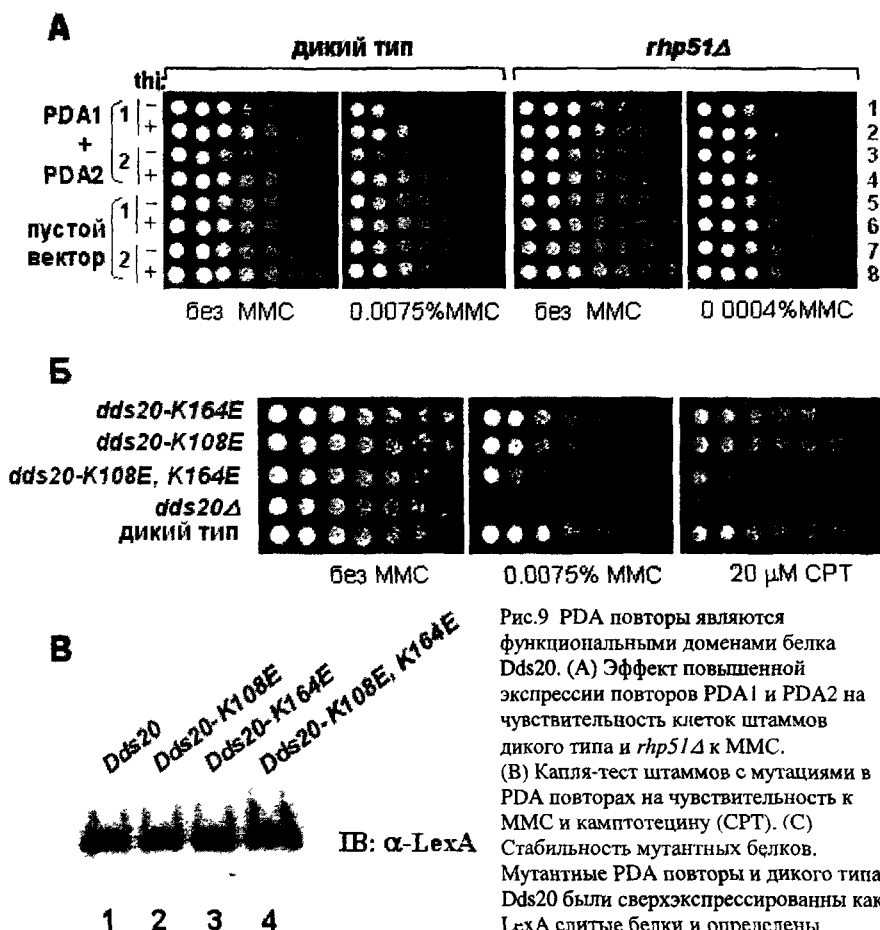


Рис.9 PDA повторы являются функциональными доменами белка Dds20. (A) Эффект повышенной экспрессии повторов PDA1 и PDA2 на чувствительность клеток штаммов дикого типа и *rhp51Δ* к MMC. (B) Капля-тест штаммов с мутациями в PDA повторах на чувствительность к MMC и камптотечину (CPT). (C) Стабильность мутантных белков. Мутантные PDA повторы и дикого типа Dds20 были сверхэкспрессированы как LexA слитые белки и определены визуально в белковых экстрактах с помощью иммуноблоттинга с использованием антител к LexA.

Потеря функции белка Dds20 в репарации повреждений ДНК после введения мутаций в PDA повторы не была обусловлена дестабилизацией белковой структуры, поскольку уровни белка в клеточных экстрактах, приготовленных из всех тестируемых штаммов,

были схожими (Рис.9В). Эти данные свидетельствуют о важной роли PDA повторов в ДНК репарационной функции белка Dds20.

Ген *rlp1*⁺ кодирует новый RecA-подобный белок *S. pombe* с высокой гомологией к белку человека Hrcs2.

Ранее в клетках делящихся дрожжей *S.pombe* были обнаружены четыре RecA-подобных белка Dmc1, Rhp51, Rhp55 и Rhp57. Мы проанализировали базу данных *S. pombe* с помощью программы TBLASTN 1.4.11, используя последовательность белка Rhp55 в качестве пробы. Это позволило нам идентифицировать открытую рамку считывания SPBC1685.11 на космиде SPBC1685 (картированную на второй хромосоме), потенциально способную кодировать полипептид со значительной гомологией к белкам, принадлежащим к семейству белков Rad51/RecA. Ген был назван *rlp1*⁺ (for RecA-like protein 1). Открытая рамка считывания *rlp1*⁺ включает в себя 1094 пар оснований, которая может быть транслирована в белок с 363 аминокислотами с молекулярной массой 41,700. Белок Rlp1 имеет наибольшую степень гомологии к Rad51 паралогу человека, белку Hrcs2. Наиболее высокая гомология была характерна для N-терминальной части белков. Сравнительный анализ аминокислотных последовательностей показал, что Rlp1 имеет 28% идентичность и 44% сходность с белком человека Hrcs2, в то время как наименьшую гомологию среди RecA-подобных белков он имел с белком *S. pombe* Rhp51 (22% идентичность и 38% сходность) и с белком Rhp55 (20% идентичность и 34% сходность). Таким образом, Rlp1 вероятно представляет собой третий паралог *S. pombe* Rad51. Молекулярный филогенетический анализ с использованием программы ClustalX (version 1.81) также показал близкое сходство двух белков, Rlp1 и Hrcs2. Все члены семейства RecA-подобных белков имеют два NTP связывающих домена: Walker A домен (GxxxxGKT/S) и Walker B домен с характерным гидрофобным профилем. Мы обнаружили у Rlp1 лишь характерный Walker A домен. В целом гомология белка Rlp1 с RecA-подобными белками предполагает его участие в рекомбинационной репарации повреждений ДНК.

***rlp1*⁺ является ДНК репарационным геном, действующим в одном пути репарации с *rhp51*⁺, *rhp54*⁺ и *rhp55*⁺.**

Чтобы проверить наше предположение обладает ли ген *rlp1*⁺ функцией в репарации повреждений ДНК, мы использовали нуль аллель гена, который был сконструирован замещением полной рамки считывания гена на маркер *KanMX*, придающий клеткам

устойчивость к генетицину. Делеционные мутанты RecA-подобных генов, вовлеченных в рекомбинационную репарацию двуцепочечных разрывов ДНК в делящихся дрожжах, являются чувствительными к алкилирующему агенту ММС. Среди них мутанты по генам паралогов *Rad51*, *rhp55⁺* и *rhp57⁺*, показывают необычный фенотип: повышенную чувствительность к ДНК - повреждающим агентам при низких температурах. Мы проверили чувствительность штамма *rlp1Δ::KanMX* к метилметансульфонату при 30°C и 23°C в эксперименте «капля-тест». Как показано на рис 10А, мутант *rlp1* показал чувствительность к 0.005% и 0.0075% ММС при 30°, и его чувствительность не увеличивалась при понижении температуры до 23°C. Как известно, действие ММС приводит к задержке репликации ДНК, что может сказаться на результатах, полученных в эксперименте «капля-тест» (замедленный рост клеток может маскировать смерть клеток). Поэтому мы провели опыты по острой инкубации клеток с ММС, которые показали, что мутант *rlp1* действительно обладает сниженной жизнеспособностью при воздействии ММС на клетки (Рис.10Б). Однако в целом выживаемость клеток *rlp1* и в этом случае была выше, чем у мутанта *rhp55*. В клетках *S. pombe* гены *rhp51⁺*, *rhp54⁺*, *rhp55⁺* и *rad22⁺* были определены, используя генетический анализ, в одну эпистатическую группу рекомбинационной репарации. Так как белок Rlp1 показывает гомологию с RecA-подобными белками, правомерным являлось предположение, что Rlp1 функционирует в том же пути репарации ДНК. Чтобы проверить это предположение мы провели эпистатический анализ гена *rlp1⁺*. Двойные мутанты *rlp1rhp51*, *rlp1rhp55* и *rlp1rad22* и одиночные мутанты по этим генам были тестированы на чувствительность к ММС (Рис.11). Мутанты *rhp51*, *rhp55* и *rad22* оказались значительно чувствительнее к низким дозам ММС, чем мутант *rlp1*, что свидетельствует о наименее важной роли белка Rlp1 в репарации повреждений ДНК вызванных действием ММС. Двойные мутанты *rlp1rhp51*, *rlp1rhp55* и *rlp1rad22* были чувствительными к ММС в той же степени, что и одиночные мутанты *rhp51*, *rhp55* и *rad22*, указывая на то, что *rlp1⁺* является эпистатичным по отношению к этим генам, а значит, работает вместе с ними при репарации повреждений ДНК вызываемых ММС. Известно, что спектр повреждений, возникающих при обработке клеток ММС, довольно широк и двуцепочечные разрывы ДНК составляют только часть повреждений, вызываемых действием этого вещества. Поэтому мы расширили наш эпистатический анализ гена *rlp1⁺* использованием ионизирующей радиации, вызывающей главным образом двуцепочечные разрывы ДНК.

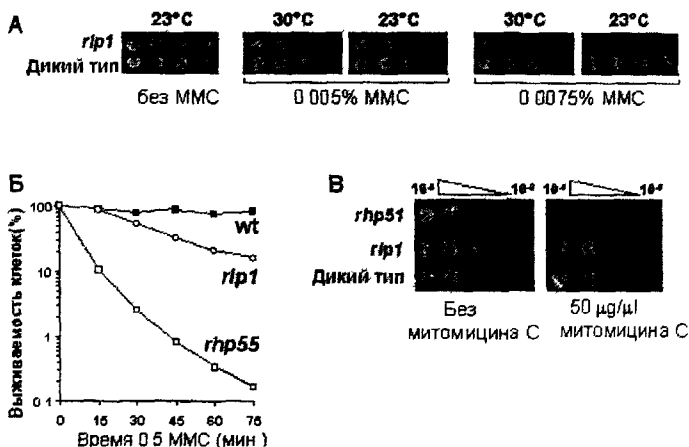


Рис.10. Чувствительность к MMC и эпистатический анализ гена *rlp1*⁺. (А) Тест MMC выживаемости мутанта *rlp1* при двух различных температурах - при 30°C и при 23°C (Б) Выживаемость мутанта *rlp1* при временной экспозиции MMC. (В) Тест на чувствительность к митомцину С.

Рис.12 показывает, что мутант *rlp1* проявляет чувствительность к γ лучам, хотя и значительно меньшую по сравнению с мутантами *rhp51* и *rhp55*. Эти данные подтверждают наши результаты по чувствительности мутанта *rlp1* к MMC и указывают, что белок Rlp1 имеет функцию в репарации двуцепочечных разрывов ДНК, хотя его роль и не является такой критической как у белков Rhp51 и Rhp55. Двойные мутанты *rlp1rhp51* и *rlp1rhp55* показали ту же чувствительность к γ лучам, что и одиночные мутанты *rhp51* и *rhp55*. Вместе взятые, результаты, полученные в экспериментах с MMC и γ лучами, показывают, что *rlp1* является эпистатичным к генам *rhp51*⁺ и *rhp55*⁺ и функционирует в том же пути репарации ДНК, а именно в механизме рекомбинационной репарации двуцепочечных разрывов ДНК. Таким образом, Rlp1 – новый RecA-подобный белок рекомбинационной репарации.

rlp1 не играет существенной роли в репарации повреждений ДНК, вызванных действием УФ света и в клеточном ответе при повреждениях репликационных вилок.

УФ повреждения ДНК вызывают образование пиримидиновых димеров и пиримидин 6-4 фотопродуктов, которые являются препятствием для движущихся репликационных вилок. Гены рекомбинационной репарации играют важную роль в клеточной выживаемости при УФ повреждениях ДНК, участвуя в UVDE пути репарации и в механизме толерантности к УФ повреждениям ДНК. Мутанты *S pombe* по генам рекомбинационной репарации ДНК показывают значительную гиперчувствительность к УФ свету. Кроме того, эти мутанты также чувствительны к камптотецину, ингибитору ДНК топоизомеразы I, который вводит одно-цепочечные надрезы в ДНК, приводящие к коллапсу репликационных вилок. Поскольку ген *rlp1*⁺ принадлежит к эпистатической группе рекомбинационной репарации, мы проверили, является ли мутант *rlp1* чувствительным к УФ свету и камптотецину. Тогда как мутант *rhp55* показал ожидаемую нами значительную чувствительность к УФ свету, мутант *rlp1* оказался устойчивым к УФ повреждениям ДНК, как и штамм дикого типа. Кроме того, делеция гена *rlp1*⁺ не приводила к чувствительности к камптотецину, в то время как мутанты *rhp51* и *rhp55* показали высокую чувствительность к антибиотику (Рис.12В) Отсутствие УФ и камптотецин - чувствительного фенотипа отличает *rlp1Δ* от других мутантов по генам рекомбинационной репарации.

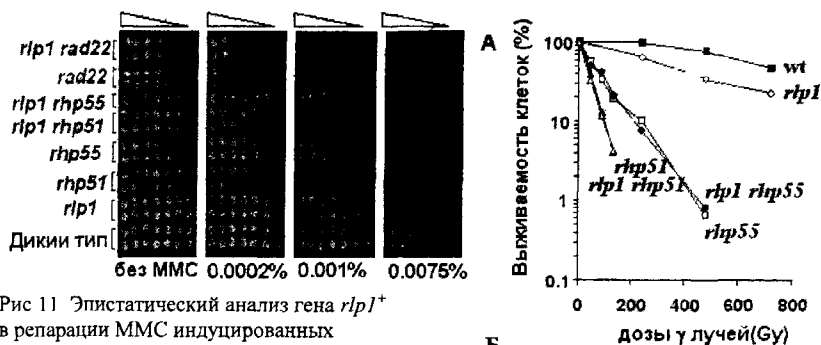
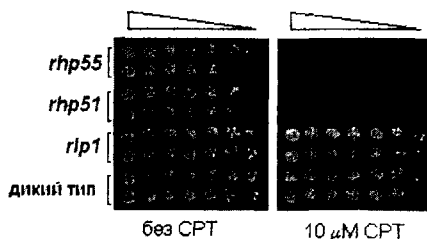


Рис 11 Эпистатический анализ гена *rlp1*⁺ в репарации MMC индуцированных повреждений ДНК.

Рис 12. (А) Эпистатический анализ гена *rlp1*⁺ в репарации повреждений, вызванных действием γ лучей (Б) Тест на чувствительность мутанта *rlp1* к агенту, затрудняющему репликацию Для определения чувствительности клеток к 10 μМ камптотецину (СРТ) были использованы клетки в пятикратных разведениях.



Мейоз и переключение типа спаривания в мутанте *rlp1*.

Мутанты *S. pombe rhp51*, *rhp55* и *rad22* характеризуются такими мейотическими дефектами как сниженные эффективность споруляции и жизнеспособность спор. В связи с этим мы проверили споруляционные фенотипы мутанта *rlp1*. Для этого мы провели скрещивания штаммов дикого типа и мутанта *rlp1Δ*. Эффективность споруляции и жизнеспособность спор в скрещивании дикого типа были на уровне 33% и 95%, соответственно, тогда как в скрещивании клеток *rlp1* эффективность споруляции была уменьшена в 2.3-раза (14.3%), а жизнеспособность спор оказалась на уровне (95%) скрещивания клеток дикого типа.

Переключение типа спаривания в клетках *S. pombe* инициируется повреждением ДНК (вероятно одно-цепочечным надрезом или другими модификациями ДНК) в каскаде *mat1*, который, по-видимому, конвертируется репликацией ДНК в двуцепочечный разрыв ДНК. Впоследствии этот двуцепочечный разрыв ДНК репарируется рекомбинационным механизмом. Нарушения рекомбинационной репарации двуцепочечных разрывов ДНК может приводить к дефекту переключения типа спаривания. Действительно, мутанты по репарации двуцепочечных разрывов ДНК, *rad22*, *rhp51* и *rhp55*, являются дефектными в переключении типа спаривания. Мы скрестили штамм *h⁺rlp1Δ* со штаммом *h⁹⁰rlp1Δ*, чтобы получить гомоталический штамм *h⁹⁰rlp1Δ*, и проанализировали с помощью микроманипулятора потомство образующихся тетрад. В общей сложности двадцать жизнеспособных тетрад были проанализированы на генотип содержащихся в них индивидуальных спор. Среди них мы обнаружили 4 тетрады с не родительским дитипом, включающие в себя две *h⁹⁰rlp1Δ* (йод - позитивные) и две *h⁺rlp1⁺* (йод - негативные) споры. Выделенные споровые клоны *h⁹⁰rlp1* при высева на споруляционную среду положительно окрашивались парами йода, как и родительские штаммы *h⁹⁰* дикого типа, показывая нормальную способность к переключению типа спаривания и образованию спор у мутанта *h⁹⁰rlp1*. Более того, штамм *h⁹⁰rlp1* не сегрегировал на йод - негативные (не переключающиеся) гетероталические колонии, как это наблюдали в ряде мутантных клеток с дефектом в переключении типа спаривания. Таким образом, наши данные указывают, что мутант *rlp1* не имеет дефекта в переключении типа спаривания.

Двугибридный анализ взаимодействия Rlp1 с другими белками рекомбинационной репарации.

Ранее были идентифицированы множественные взаимодействия между белками рекомбинационной репарации в *S. pombe*. Среди них два Rad51 паралога *S. pombe*, Rhp55 и Rhp57, образуют гетеродимер, который взаимодействует с N-терминальной частью Rhp51 через Rhp57 субъединицу. Поскольку наши данные предполагают, что Rlp1 является третьим паралогом белка Rad51 в *S. pombe*, и принадлежит к группе белков рекомбинационного пути репарации двуцепочечных разрывов ДНК, мы провели систематический анализ взаимодействий между Rlp1 и другими членами группы рекомбинационной репарации в *S. pombe*, используя дрожжевую двугибридную систему. Были сконструированы N-терминальные слияния полно размерного белка Rlp1 с DBD и AD соответствующих векторов и количественно оценены по парные взаимодействия Rlp1 с другими белками RAD52 группы. Взаимодействия между белками Rlp1 и Rhp51, и Rlp1 и Rhp55 не обнаружены. Мы расширили наш анализ по взаимодействию Rlp1 и Rhp51 использованием более стабильных делеционных версий белка Rhp51, Rhp51ΔC (aa 1-117) и Rhp51ΔN (aa 114-365). Наши данные показывают, что и делеционные формы белка Rhp51 не взаимодействуют с белком Rlp1. В результате мы заключили, что Rlp1 не взаимодействует с Rhp51. Нами не были также выявлены взаимодействия Rlp1 с другим RecA – подобным белком Rhp55, а также с белками Rhp54 и Rad22. Однако мы постоянно наблюдали почти 6-кратное увеличение β-галактозидазной активности, указывающей на взаимодействие между белками Rlp1 и Rhp57. Наши данные предполагают, что Rlp1, подобно *S. pombe* Rhp55, вероятно не напрямую ассоциирован с рекомбиназой Rhp51, а образует временный комплекс с субъединицей Rhp57 гетеродимера Rhp55/Rhp57, взаимодействующего непосредственно с Rhp51.

Выводы.

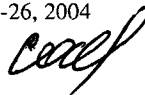
1. Идентифицированы два новых гена делящихся дрожжей *Schizosaccharomyces pombe* *dds20⁺* и *rlp1⁺*, участвующие в механизме репарации двуцепочечных разрывов ДНК
2. Показано, что ген *dds20⁺* является высококопийным супрессором чувствительности к γ лучам, метилметансульфонату и УФ лучам мутантных клеток с делециями в генах *rhp55⁺* и *rhp57⁺*, кодирующих паралоги ключевого белка рекомбинационной репарации Rad51.
3. Установлено, что мутант *dds20Δ* проявляет уникальный фенотип - холодочувствительность в репарации УФ и MMC-индуцированных повреждений ДНК, свидетельствующий о вероятной роли белка Dds20 в образовании и/или стабилизации

мультипротеинового комплекса, участвующего в механизме рекомбинационной репарации.

4. Обнаружен новый Rhp51-зависимый механизм рекомбинационной репарации, контролируемый белком Dds20 и действующий параллельно пути контролируемом Rad51 паралогами.
5. Установлено, что Dds20 взаимодействует *in vivo* с белком Rhp51, образующим Rhp51-ДНК нуклеопротеиновый филамент.
6. Показано, что белок Dds20 функционирует в новом Cds1p-независимом пути толерантности к повреждениям ДНК, вызванным действием УФ света.
7. Обнаружен новый тип белковых повторов (повторы PDA), который может представлять собой структурный модуль, опосредующий взаимодействие между белками. Нарушение репарационной способности белка Dds20 введением мутаций в PDA повторы с помощью сайт-направленного мутагенеза показывает, что PDA повторы являются важной функциональной частью белка Dds20.
8. Выдвинута гипотеза о медиаторной роли белка Dds20 в сборке Rhp51 нуклеопротеинового филамента вне S-фазы клеточного цикла.
9. Обнаружен новый RecA-подобный ген *rlp1*⁺, кодирующий третий Rad51 паралог *Schizosaccharomyces pombe*. С помощью эпистатического анализа установлено, что *rlp1*⁺ принадлежит к RAD52 группе генов рекомбинационной репарации ДНК. Делеция гена *rlp1*⁺ приводит к чувствительности клеток к метилметансульфонату и γ лучам.
10. Rlp1 не играет существенной роли в репарации повреждений ДНК, вызванных действием УФ света и в клеточном ответе при повреждениях репликационных вилок. Не обнаружено существенной роли Rlp1 в переключении типа спаривания и мейозе.
11. Показано, что Rlp1 имеет высокую степень гомологии с Rad51 паралогом человека, белком Xrcc2. Однако отсутствие чувствительности *rlp1* мутанта к митомицину C не позволяет считать его непосредственным функциональным гомологом Xrcc2. Идентификация Rlp1 и анализ свойств делеционного мутанта демонстрирует функциональное разнообразие и специализацию RecA-подобных белков в ряду от дрожжей до позвоночных.

Список работ, опубликованных по теме диссертации.

- 1) Khasanov F.K., Salakhova A.F., Chepuraja O. V., Korolev V.G., Bashkurov V.I. Identification and characterization of the *rlp1⁺*, the novel Rad51 paralog in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. DNA Repair. 2004. 3:1363–1374
- 2) Салахова А.Ф., Савченко Г.В., Хасанов Ф.К., Чепурная О.В., Королёв В.Г., Башкиров В.И. Ген *dds20⁺* контролирует новый Rad51^{Sp}-зависимый путь рекомбинационной репарации в *Schizosaccharomyces pombe*. Генетика. 2005. 41: 1-10
- 3) Khasanov F.K., Savchenko G.V., Salakhova A.F., Vagin D.A., Bashkurov V.I. Fission yeast *dds20⁺* defines a novel pathway of DNA damage tolerance. Meeting of International Research Scholars of Howard Hughes Medical Institute. June 20-23 2001, Vancouver, Canada
- 4) Khasanov F.K., Salakhova A.F., Hartsuiker E., Savchenko G.V., Korolev V.G., Kohli J., Carr A.M., Bashkurov V.I. Novel Rad51^{Sp}-dependent pathway of recombination/repair in *Schizosaccharomyces pombe* mediated by Dds20 protein. Genetic Recombination & Genome Rearrangements. FASEB Meeting July 26-31 2004 Snowmass Village, Snowmass, Colorado, USA.
- 5) Khasanov F.K., Salakhova A.F., Savchenko G.V., Hartsuiker E., Korolev V.G., Carr A.M., Bashkurov V.I. Novel Rad51^{Sp}-dependent pathway of recombination/repair in *Schizosaccharomyces pombe* mediated by Dds20 protein. Meeting of International Research Scholars of Howard Hughes Medical Institute, Tallinn, Estonia, June 23-26, 2004



Принято к исполнению 27/04/2005
Исполнено 27/04/2005

Заказ № 798
Тираж: 100 экз

ООО «11-й ФОРМАТ» ИНН 7726330900
Москва, Балаклавский пр-т, 20-2-93
(095) 747-64-70
www.autoreferat.ru

РНБ Русский фонд

2005-4
45441

07 МАР 2005

701