

DOI: 10.31116/tsitol.2018.07.13

## ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ПРОДУКТА ГЕНА *HIM1* С ГЕЛИКАЗАМИ *Srs2* (RadH) И *Mph1* ДРОЖЖЕЙ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

© Е. А. Алексеева,\* Т. А. Евстюхина, В. Т. Пешехонов, В. Г. Королев

Петербургский институт ядерной физики им. Б. П. Константинова  
Национального исследовательского центра «Курчатовский институт»,  
Гатчина, Ленинградская обл., 188300;

\* электронный адрес: [alekseeva\\_ea@npi.nrcki.ru](mailto:alekseeva_ea@npi.nrcki.ru)

В настоящей работе мы рассмотрели взаимодействие пока еще не до конца изученного белка *Him1*, с геликазами *Srs2* и *Mph1*. Эти геликазы участвуют в процессинге D-петли, которая является основным интермедиатом безошибочной ветви пострепликативной репарации (ПРР), осуществляющейся по рекомбинационному механизму смены матриц. По нашим данным, ген *HIM1*, продуктом которого является белок *Him1*, может участвовать в регуляции безошибочной ветви ПРР. Последняя является основной системой репарации клетки, осуществляющейся при нормальном метаболизме в процессе репликации. Нарушения в работе ПРР могут приводить к возникновению у человека многих наследственных заболеваний и канцерогенезу.

Ключевые слова: *HIM1*, дрожжи, пострепликативная репарация, УФ-индуцированный мутагенез

Принятые сокращения: ПРР — пострепликативная репарация, УФ — ультрафиолетовое излучение, High Induced Mutagenesis, *Srs2* -Suppressor of Rad Six, *Mph1* — Mutator P<sup>h</sup>enotype.

Эффективная и точная репарация ДНК является важным процессом для поддержания стабильности генома клетки. Активно делящиеся клетки в ответ на повреждение генома используют в первую очередь репарационные системы, которые удаляют повреждения ДНК во всех участках. Повреждения ДНК, которые остались неликвидированными перед входом в фазу S клеточного цикла, представляют серьезную проблему в ходе репликации, поэтому в процессе эволюции клетки выработали уникальную систему толерантности к повреждениям ДНК. Механизмы толерантности к повреждениям ДНК играют ключевую роль в организации завершения репликации поврежденной матричной ДНК. В эукариотах толерантность к повреждениям, которая контролируется *RAD6*-эпистатической группой генов, обычно называют пострепликативной репарацией (ПРР).

Генетические исследования на модели дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* показали, что ПРР разделяется на два конкурирующих пути — ошибочную и безошибочную ветви репарации. Безошибочная ветвь ПРР осуществляется по рекомбинационному механизму смены матрицы. Ключевым интермедиатом этого процесса является D-петля, которая возникает на ранней стадии рекомбинационного процесса.

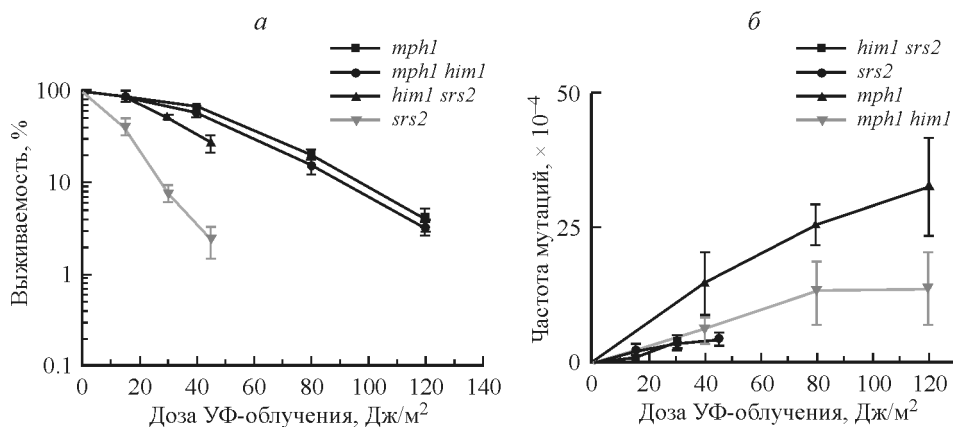
Ранее в нашей лаборатории получена коллекция мутантов дрожжей с высокой чувствительностью к мутагенному действию различных ДНК-тропных агентов. Генетический анализ показал, что эти мутанты можно раз-

делять на четыре эпистатические группы. В ходе последнего изучения выяснено, что гены *HSM2*, *HSM3*, *HSM6* и *HIM1* контролируют безошибочную ветвь ПРР и входят в одну эпистатическую группу в отношении контроля УФ-индуцированного мутагенеза.

Целью настоящего исследования стало изучение связи фенотипического проявления мутаций в гене *HIM1* (High Induced Mutagenesis) с образованием D-петли. *HIM1* кодирует белок *Him1*, биохимическая функция которого в настоящее время неизвестна. Известно, что мутации в *HIM1* приводят к увеличению как спонтанного, так и УФ-индуцированного мутагенеза. Также мутация *him1* приводит к увеличению частоты конверсий и уменьшению частоты кроссинговера (Kelberg et al., 2005).

Для решения поставленной задачи мы использовали штаммы, мутантные по генам, кодирующим геликазы *Srs2* и *Mph1*, контролирующие разные стадии образования D-петли. *Srs2* обладает геликазной и ДНК-зависимой АТФазной активностью и является функциональным аналогом белка человека RTEL1. Эта геликаза способна вытеснять белок Rad51 из рекомбинационных интермедиатов, что приводит к подавлению гомологичной рекомбинации (Kolesar et al., 2016).

Основная функция геликазы *Mph1*, функционального аналога белка человека FANCM, состоит в разрушении излишних или непродуктивных D-петель. Мутации в гене *FANCM* могут приводить к возникновению наследственных заболеваний, например к анемии Фанкони и некото-



Выживаемость (а) и частота мутагенеза по пяти локусам *ADE4—ADE8* (б) при действии разных доз УФ на клетки мутантов *mph1*, *mph1him1*, *srs2* и *him1srs2*.

рым другим, связанным с нарушениями в работе генов репарационных систем (Zheng et al., 2011; Stafa et al., 2014).

### Материал и методика

**Штаммы и культивирование.** Одиночные мутанты *him1*, *srs2* и *mph1* получили разрушением соответствующих генов в штамме дикого типа (2D-3034). Двойные мутанты *him1srs2* и *mph1him1* получили разрушением соответствующих генов в штаммах *him1* и *mph1*. В работе использовали стандартные среды полного и минимального составов (Захаров и др., 1984). В некоторых экспериментах использовали жидкую полную среду без добавления агара. При работе с ауксотрофными мутантами в минимальную среду добавляли необходимые для роста метаболиты из расчета 20 мг/л для аминокислот и азотистых оснований. При учете частоты УФ-индуцированных мутаций по 5 локусам *ADE4—ADE8* использовали среду, содержащую спирт (Ковальцова, Королев, 1996).

**Мутационные тесты.** Чувствительность к летальному действию УФ определяли, снимая кривые выживаемости в зависимости от дозы мутагена (Захаров и др., 1984). Чувствительность к мутагенному действию определяли по индукции прямых мутаций в пяти локусах *ADE* (Roman, 1956). Проводили не менее 4 повторностей эксперимента для каждого из исследуемых штаммов. На графиках приведены средние значения с 95%-ными доверительными интервалами.

### Результаты и обсуждение

Чтобы выяснить, как взаимодействует продукт *HIM1* с геликазами *Srs2* и *Mph1* дрожжей *S. cerevisiae*, мы определили выживаемость и уровень УФ-индуцированного мутагенеза у двойных мутантов *him1srs2* и *mph1him1* и одиночных мутантов *srs2* и *mph1*.

Совмещение мутаций *srs2* и *him1* в одной клетке привело к резкому увеличению выживаемости клеток двойного мутанта по сравнению с одиночным мутантом *srs2* (см. рисунок, а). Уровень УФ-индуцированного мутагенеза у двойного мутанта *srs2him1* не отличался от такового для одиночного мутанта *srs2* (см. рисунок, б). Так как мутация *srs2* приводит к избыточному количеству интер-

медиатов гомологичной рекомбинации, которые цитотоксичны, из полученных данных можно сделать вывод о том, что мутация *him1* противодействует образованию этой избыточности, тем самым спасая клетки от гибели. Это противодействие, возможно, связано с дестабилизацией D-петли, вызванной мутацией *him1*.

Для проверки этого предположения мы оценили взаимодействие мутации *him1* с мутацией *mph1*. Известно, что мутация *mph1* инактивирует геликазу, которая разрушает D-петли, в результате равновесие между ошибочной и безошибочной ветвями ПРР сдвигается в сторону безошибочной ветви. Двойной мутант *mph1him1* показал УФ-резистентность, неотличимую от одиночных мутантов (см. рисунок, а). В то же время уровень УФ-мутагенеза у двойного мутанта оказался ниже, чем у одиночного мутанта (см. рисунок, б).

Результаты наших экспериментов показывают, что повышенное УФ-индуцированное действие мутации *him1* полностью компенсируется введением мутации *mph1*. Следовательно, мутаторный фенотип мутации *him1* можно объяснить тем, что она дестабилизирует D-петлю.

Полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что функция белка *Him1* имеет отношение к стабилизации D-петли, возникающей при обходе повреждений ДНК в процессе ПРР.

Работа поддержана грантом РФФИ № 18-34-00540.

### Список литературы

- Захаров И. А., Кожин С. А., Кожина Т. А., Федорова И. В. 1984. Сборник методик по генетике дрожжей-сахаромицетов. Л.: Наука. 144 с. (Zaharov I. A., Kogin S. A., Kogina T. A., Fedorova I. V. 1984. A collection of techniques for the genetics of yeast-saccharomycetes. Leningrad: Nauka. 144 p.)
- Ковальцова С. В., Королев В. Г. 1996. Штамм дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* для тестирования мутагенов окружающей среды, основанный на взаимодействии мутаций *rad2* и *him1*. Генетика. 32(3): 366—372. (Kovaltsova S. V., Korolev V. G. 1996. A strain of yeast *Saccharomyces cerevisiae* for testing environmental mutagens, based on the interaction of mutations of *rad2* and *him1*. Genetics. 32 (3) : 366—372.)
- Kelberg E. P., Kovaltsova S. V., Alekseev S. Yu., Fedorova I. V., Gracheva L. M., Evstukhina T. A., Korolev V. G. 2005. *HIM1*, a new yeast *Saccharomyces cerevisiae* gene playing a role in control of spontaneous and induced mutagenesis. Mut. Res. 578 : 64—78.

Kolesar P., Altmannova V., Silva S., Lisby M., Krejci L. 2016. Pro-recombination role of Srs2 protein requires SUMO (Small Ubiquitin-like Modifier) but is independent of PCNA (Proliferating cell Nuclear Antigen) interaction. J. Biochem. 291 : 7594—7607.

Roman H. 1956. A system selective for mutations affecting the synthesis of adenine in yeast. Compt. Rend. Trav. Lab. Carlsberg. Ser. Physiol. 26 : 299—314.

Stafa A., Donnianni R. A., Timashev L. A., Lam A. F., Symington L. S. 2014. Template switching during break-induced replication is promoted by the Mph1 helicase in *Saccharomyces cerevisiae*. Genetics. 196 : 1017—1028.

Zheng X.-F., Prakash R., Saro D., Longerich S., Nui H., Sung P. 2011. Processing of DNA structures via DNA unwinding and branch migration by the *S. cerevisiae* Mph1 protein. DNA Repair (Amsterdam). 10 : 1034—1043.

Поступила 7 III 2018

INTERACTION OF THE *HIM1* GENE PRODUCT WITH HELICASES Srs2 (RadH)  
AND Mph1 YEAST *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

*E. A. Alekseeva,\* T. A. Evstyukhina, V. T. Peshekhonov, V. G. Korolev*

B. P. Konstantinov Petersburg Nuclear Physics Institute, National Research Centre «Kurchatov Institute»,  
Gatchina, Leningrad Region, 188300;

\* e-mail: alekseeva\_ea@pnpi.nrcki.ru

We examined the interaction of the Him1 protein with the Srs2 and Mph1 helicases. These helicases are involved in the process of D-loop formation, which is the main intermediate of the error-free post-replicative repair (PRR) branch, carried out by the recombination mechanism of matrix replacement. According to our data, the *HIM1* gene, the product of which is the Him1 protein, can participate in the regulation of the error-free post-replicative repair branch. PRR is the main repair system that is carried out under normal cell metabolism during replication. Disturbances in the work of PRR can lead to the appearance in humans of many inherited diseases and carcinogenesis.

Key words: *HIM1*, yeast, post-replicative repair, UV-induced mutagenesis

---