

## ГЕНЕТИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ РЕПАРАЦИИ ПРОТЯЖЕННЫХ НЕГОМОЛОГИЧЕСКИХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ У ДРОЖЖЕЙ

Репарация генетических повреждений — это свойство живых организмов восстанавливать нормальную структуру ДНК, нарушенную в результате как ошибок репликации, т. е. спонтанно, так и при воздействии разнообразных мутагенных факторов радиационной или химической природы. Среди повреждений ДНК особое место занимают ошибочно спаренные основания и микропетли. Для устранения таких типов повреждений в клетках существует целая система ферментов, которая ответственна за устранение таких дефектов. Синтез таких белковых структур находится под генетическим контролем, соответственно существует система генов, осуществляющих эту так называемую мисматч-репарацию (от англ. mismatch). Механизмы этого пути репарации достаточно универсальны и существуют у организмов разной степени организации, в том числе и у дрожжей. Однако известно, что эта репарация в состоянии устранить повреждения протяженностью не более 8 пар нуклеотидов, механизмы репарации более протяженных негомологических последовательностей до сих пор изучены недостаточно.

Задачей настоящей работы было изучение возможностей репарации плазмидной ДНК, содержащей участок негомологии протяженностью порядка 130 пар нуклеотидов, и выяснение роли эксцизионной и рекомбинационной репарации в этом процессе. Для этого была использована челночная плазида, содержащая дрожжевые гены *ADE2* и *TRP1*, а также протяженную негомологию в области фагового ориджина. Эта негомология была получена отжигом фрагментов двунитевой плазмидной ДНК на одностречковом кольце, причем область фагового ориджина в двунитевой ДНК и одностречковой имела разные направления. С помощью такой плазмиды проводилась трансформация штаммов разного генотипа и велось наблюдение за дальнейшей судьбой генов *ADE2* и *TRP1*, содержащихся в плазмиде. Отбор трансформантов производился по признаку триптофан-независимости. Потеря плазмидного гена *ADE2*, которая могла произойти в процессе ликвидации протяженной негомологии, вела к тому, что колонии трансформантов приобретали красную окраску, поскольку мутация *ade2*, содержащаяся в геноме реципиента, приводила к накоплению красного пигмента.

Для трансформации использовали три дрожжевых штамма — штамм дикого типа, штамм с блоком эксцизионной репарации и штамм с блоком рекомбинационной репарации. После трансформации подсчитывалось соотношение белых и красных клонов, что позволяло судить о процессах, происходящих с плазмидными генами *ADE2* и *TRP1*, а также о том, какие виды репарации задействованы в этих процессах. Основные полученные нами результаты приведены в табл. 1.

Таблица 1. Соотношение белых и красных колоний, наблюдаемое среди трансформантов разного генотипа.

Штамм	Просмотрено колоний	Из них красных	Процент красных
<i>wt</i>	2434	72	2.9 ± 0.3
<i>rad54</i>	2651	33	1.2 ± 0.2
<i>rad1</i>	231	16	6.9 ± 1.6

Приведенные результаты показывают достоверное различие в частоте появления красных колоний, наблюдаемое у штаммов разного генотипа. Это позволяет предполагать, что эксцизионная и рекомбинационная репарация принимают участие в ликвидации

протяженных негомологий. Возможные механизмы процессов, происходящих в трансформированных клетках, обсуждаются.

Задачи последующей работы состоят в выявлении структуры плазмид, содержащихся в трансформантах, с помощью молекулярно-генетических методов.