

УДК 575.1:579.852.11

РЕКОМБИНАЦИОННАЯ РЕПАРАЦИЯ В *Schizosaccharomyces pombe*: РОЛЬ МЕДИАТОРНЫХ БЕЛКОВ

© 2012 г. О. С. Хасанова^{1,2}, Д. А. Вагин¹, Ф. К. Хасанов^{1,2*}

¹Институт биологии гена Российской академии наук, Москва, 119334

²Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, 119991

Поступила в редакцию 30.01.2012 г.

Принята к печати 05.04.2012 г.

Репарация двухцепочечных разрывов ДНК, возникающих спонтанно или в результате внешних воздействий, считается критическим фактором клеточной выживаемости. Эволюционно консервативный безошибочный механизм рекомбинационной репарации имеет ряд сходных черт у низших эукариот и у позвоночных и играет основную роль в поддержании стабильности генома. В этом обзоре рассмотрены имеющиеся на сегодняшний день сведения по механизмам рекомбинационной репарации двухцепочечных разрывов ДНК в делящихся дрожжах *Schizosaccharomyces pombe* и различия между механизмами этого типа репарации в *Saccharomyces cerevisiae* и у высших эукариот.

Ключевые слова: дрожжи, повреждения ДНК, рекомбинационная репарация, стабильность генома.

RECOMBINATIONAL REPAIR IN *Schizosaccharomyces pombe*: THE ROLE OF MEDIATOR PROTEINS, by O. S. Khasanova^{1,2}, D. A. Vagin¹, F. K. Khasanov^{1,2*} (¹Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119334 Russia; ²Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Science, Moscow, 119991 Russia; *e-mail: fuatka@mail.ru). Repair of double-stranded DNA breaks that occur spontaneously or under the influence of external factors, are critical for cell survival. Evolutionarily conserved mechanism for error-free recombinational repair plays a major role in maintaining genome integrity. Repair pathway is conservative and has a number of similarities in lower eukaryotes and vertebrates. This review examines the current state of studying the mechanism of recombinational repair double-stranded DNA breaks in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*, notes the differences of this type of repair in *Saccharomyces cerevisiae* and higher eukaryotes.

Keywords: yeast, DNA damage, recombinational repair, genome integrity.

ВВЕДЕНИЕ

Двухцепочечные разрывы (ДЦР) ДНК представляют собой серьезную опасность для клетки как с точки зрения ее жизнеспособности, так и стабильности ее генома. ДЦР возникают при действии различных экзогенных факторов на ДНК. Ионизирующая радиация может приводить к образованию ДЦР напрямую, а также опосредованным способом через свободные радикалы кислорода. ДЦР могут быть также результатом двух близко расположенных одноцепочечных разрывов ДНК. Более того, ДЦР ДНК – это интермедиаты процесса мейотической рекомбинации. Непарированные или неправильно репарированные разрывы ДНК приводят к мутациям, геномным перестройкам и генетической нестабильности – столь обычным явлениям в опухолевых клетках

высших эукариот. В ответ на повреждения ДНК происходит остановка клеточного цикла, индуцируется транскрипция репарационных генов и включаются различные пути репарации ДНК. Механизмы контроля клеточного цикла “запускаются” в ответ на повреждения ДНК, обеспечивая выживание клетки и стабильность ее генома. Повреждения в одной цепи (одноцепочечные разрывы или повреждение оснований) могут быть репарированы с использованием комплементарной цепи в качестве матрицы, что невозможно как в случае ДЦР, так и при наличии поврежденных оснований на комплементарных цепях ДНК. ДЦР ДНК репарируются посредством прямого лигирования или отжигом одноцепочечных участков в областях прямых повторов ДНК для предотвращения потери хромосомы и повышения клеточной выживаемости, но оба этих события имеют мутагенную природу, поскольку сопровождаются делециями размером от нескольких нуклео-

Принятые сокращения: ДЦР – двухцепочечные разрывы.
* Эл. почта: fuatka@mail.ru

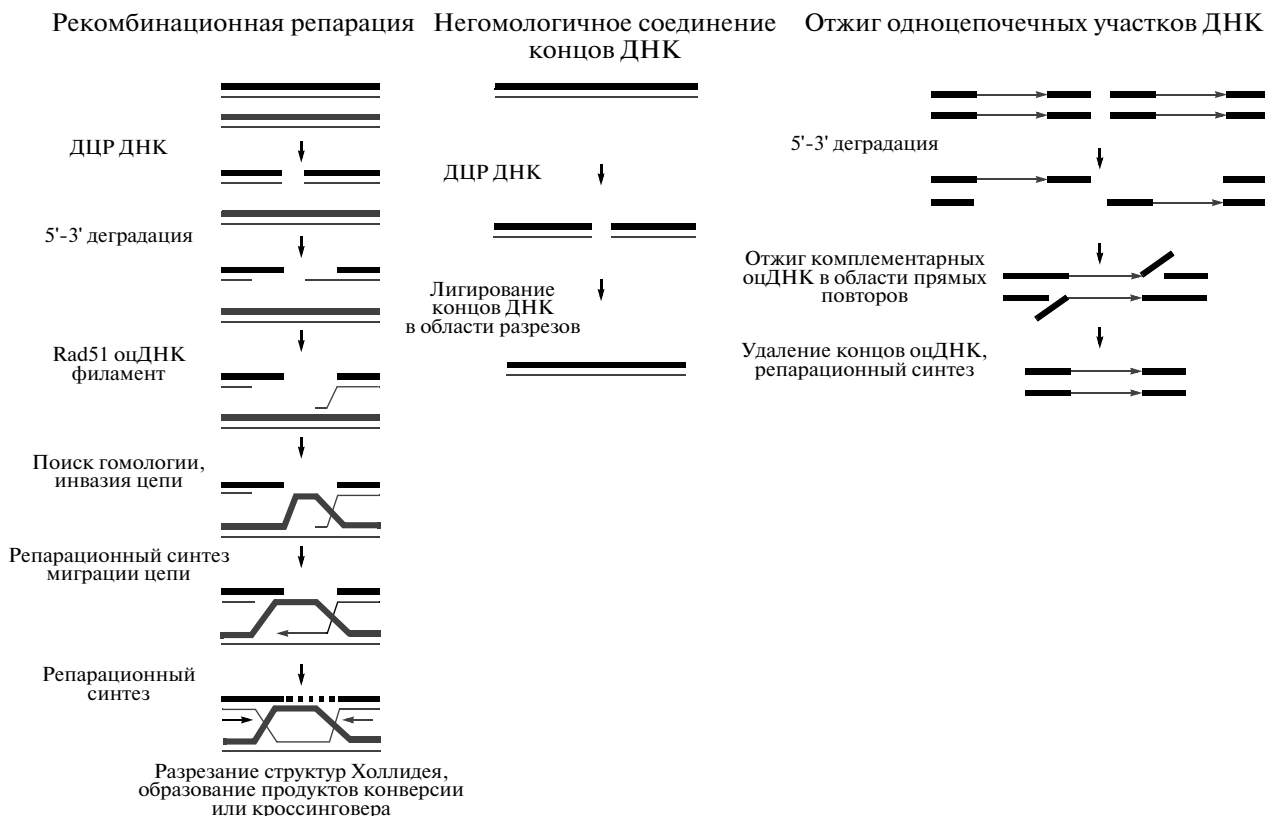


Рис. 1. Модели механизмов репарации ДЦР ДНК в клетках эукариот.

тидов до нескольких тысяч нуклеотидов (рис. 1). Альтернативный способ репарации ДЦР ДНК, характеризующийся высокой точностью, — это гомологичная рекомбинация. Этот механизм основан на использовании информации неповрежденной сестринской хроматиды или хромосомы-гомолога для репарации ДЦР (рис. 1). Все эти пути репарации ДЦР находятся в сбалансированном состоянии в клетке, однако дрожжи *S. pombe* и *Saccharomyces cerevisiae* предпочитают использовать гомологичную рекомбинацию для репарации ДЦР, тогда как в клетках животных наиболее эффективны механизмы негомологичного соединения концов ДНК и отжига однонитевых участков ДНК в областях прямых повторов.

В *Escherichia coli* белок RecA играет центральную роль в ходе гомологичной рекомбинации. В участке разрыва ДНК белок RecA катализирует три основных события: образует комплекс с оцДНК, находит гомологичную цепь ДНК и индуцирует реакцию обмена цепей как завершающую стадию рекомбинационного процесса.

Изучение репарации ДНК у высших эукариот, главным образом, сконцентрировано на анализе генетических заболеваний, связанных с дефектами репарации повреждений генетического материала. Так что основной прогресс в этой области достигнут при изучении механизма репарации у

низших одноклеточных эукариот, а именно *S. cerevisiae*. При изучении репарации ДЦР ДНК в почкующихся дрожжах *S. cerevisiae* показано, что в рекомбинационную репарацию вовлечена эпистатическая группа генов *RAD52* [1]. Продукты *RAD52* функционируют в рекомбинационной репарации ДЦР ДНК, а также в митотической и мейотической рекомбинации. Гомологи генов группы *RAD52* обнаружены и в других эукариотических организмах, включая человека [2].

ОБРАЗОВАНИЕ ВЫСТУПАЮЩИХ ОДНОНИТЕВЫХ 3'-КОНЦОВ В УЧАСТКАХ ПОВРЕЖДЕНИЯ ДНК

Рекомбинационная репарация начинается с экзонуклеолитической деградации концов ДНК в точке ДЦР с образованием протяженных одноцепочечных участков на 3'-концах. Эти выступающие концы становятся субстратом белка Rhp51, связывающегося с оцДНК. В клетках *S. cerevisiae* и *S. pombe* двухстадийный процесс образования выступающих 3'-концов в участках ДЦР ДНК зависит от функции двух частично перекрывающихся белковых комплексов: соответственно MRX (Mre11-Rad50-Xrc2) и MRN (Rad32-Rad50-Nbs1), а также от 5'-3'-экзонуклеазы Exo1 [3]. В клетках *S. pombe* белковый комплекс MRN сов-

местно с эндонуклеазой Ctp1 (гомологом Sae2 в *S. cerevisiae*) удаляет небольшие олигонуклеотиды с концов ДЦР ДНК, образуя ранний интермедиат — короткие 3'-концевые одноцепочечные участки ДНК [4]. В дальнейшем экзонуклеаза Exo1, возможно с участием хеликазы Sgs1, процессирует эту короткую промежуточную форму до протяженно-одноцепочечного участка, необходимого для процесса рекомбинации и достаточного для последующей инвазии в дуплексную молекулу ДНК хромосомы — гомолога или сестринской хроматиды.

РЕКОМБИНАЗА Rhp51 — КЛЮЧЕВОЙ БЕЛОК ПРОЦЕССА РЕКОМБИНАЦИОННОЙ РЕПАРАЦИИ

Белок Rhp51 в клетках *S. pombe*, по-видимому, обладает теми же биохимическими свойствами и играет ту же роль в процессах рекомбинации и репарации, что и белок Rad51 в *S. cerevisiae*. Rad51 (Rhp51 в *S. pombe*) представляет собой эукариотический RecA-гомолог и выполняет две важные функции в гомологичной рекомбинации: поиск гомологии ДНК и реакцию обмена цепи. В отличие от бактериального RecA, предпочтительнее связывающегося с оцДНК чем с дцДНК, дрожжевой белок Rad51 в присутствии АТР в одинаковой степени связывается как с оцДНК, так и с дцДНК в соотношении 1 протомор на 3–4 н., образуя правозакрученный филамент [5–8]. АТР-разная активность Rad51 *S. cerevisiae* на оцДНК или дцДНК приблизительно на два порядка ниже, чем для белка RecA *E. coli* [5, 9]. По-видимому, эти различия связаны с кофакторами Rad51, в том числе медиаторными белками.

МЕДИАТОРЫ ФОРМИРОВАНИЯ НУКЛЕОПРОТЕИНОВЫХ ФИЛАМЕНТОВ Rhp51 В *S. pombe*

Гетеротримерный белковый комплекс RPA (Replication Protein A) представляет собой эукариотический эквивалент белка Ssb (single-stranded DNA-binding protein) *E. coli*, проявляющего высокое сродство к оцДНК [10]. RPA играет важную роль в различных процессах метаболизма ДНК там, где оцДНК выступает в качестве интермедиата, включая репликацию, репарацию и рекомбинацию ДНК. По одной из гипотез, RPA может выступать в роли сенсора повреждений ДНК, который и запускает механизм контроля клеточного цикла. При этом сигналом может служить образование оцДНК в результате процессинга ДЦР [11]. Роль белкового комплекса RPA в процессе репарации ДЦР ДНК сводится к устранению шпилек во вторичной структуре оцДНК, но при этом образование филамента Rad51-ДНК затруднено [12]. Белок Rhp51 не способен самосто-

ятельно загружаться на оцДНК и замещать RPA на матрице ДНК *in vitro* [13]. Ингибиторный эффект RPA на образование Rhp51-филамента преодолевается так называемыми медиаторными белками, которые выступают посредниками в образовании нуклеопротеинового филамента Rhp51 на оцДНК, покрытой белком RPA. Ключевыми медиаторными белками *S. pombe* считаются Rad22, Rhp55, Rhp57, Sfr1 и Swi5.

Белок Rad22 (Rad52 в *S. cerevisiae*) контролирует ход рекомбинационной репарации на ранних этапах — предшествующих включению в процесс Rhp51-паралогов, Rhp55 и Rhp57, — на стадии замещения белка RPA рекомбинационным белком Rhp51 на 3'-выступающих участках оцДНК. Его гомолог в клетках *S. cerevisiae*, Rad52, образует мультимерную кольцевую структуру, состоящую из 8 мономеров, которая взаимодействует предпочтительно с оцДНК посредством N-концевого ДНК-связывающего домена. Для белка Rad22 *S. pombe* нет экспериментальных доказательств в пользу такой пространственной кольцевой структуры, однако в экспериментах *in vivo* показано, что белок Rad22 склонен к олигомеризации (рис. 2). Белок Rad22 взаимодействует и с Rhp51, и с RPA, помогая Rhp51 в сборке филамента на оцДНК.

Белки *S. pombe* Rhp55 и Rhp57, принадлежащие к семейству белков RecA/Rad51, образуют гетеродимер *in vivo* в соотношении 1 : 1, который взаимодействует с Rhp51 через субъединицу Rhp57. Каждый из этих белков имеет два консервативных мотива, ответственных за связывание и гидролиз АТР, Walker “А” и Walker “В” [14, 15]. Показано, что АТР-разная активность обеих субъединиц гетеродимера необходима как для репарации индуцированных повреждений ДНК, так и для репликации ДНК. Однако повреждение одного из двух функциональных АТР-связывающих/гидролизующих доменов на гетеродимере приводит только к репарационному дефекту, но не влияет на эффективность клеточной пролиферации [16].

Медиаторный белок *S. pombe* Rlp1 (гомолог XRCC2 в клетках человека), член семейства белков RecA/Rad51, характеризуется наличием лишь одного мотива связывания и гидролиза АТР, мотива “А” [17]. В клетках *S. pombe* белок Rlp1 образует комплекс с белками Sws1, а также с Rdl1, гомологом Rad51D у человека [18]. Субъединица Rdl1, в отличие от Rlp1, характеризуется присутствием лишь одного мотива в домене связывания и гидролиза АТР, мотива “В”. Комплементационным анализом показано, что мотив Walker “А” в белке RAD51D человека критичен для функции комплекса, тогда как тот же мотив в XRCC2 не несет такой смысловой нагрузки [19]. В комплексе Rlp1-Rdl1 делящихся дрожжей функциональная АТР-разная активность также зависит от индивиду-

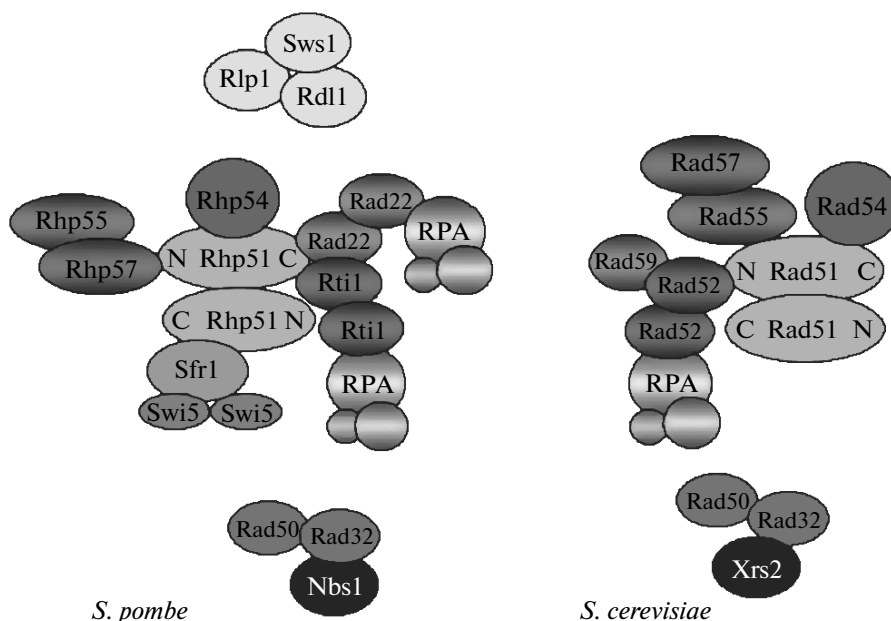


Рис. 2. Взаимодействие между белками, участвующими в рекомбинационной репарации, в клетках *S. pombe* и *S. cerevisiae*. Взаимодействия не происходят все одновременно, как можно подумать из рисунка, а носят эпизодический характер, тип взаимодействия определяется спектром выполняемых задач, связанных с репарацией ДНК. Сильные взаимодействия между белками показаны перекрывающимися эллипсоидами, а слабые — касающимися эллипсоидами.

ального вклада Walker “A” и Walker “B” мотивов отдельных субъединиц комплекса [18]. Все эти данные могут указывать на то, что как в клетках дрожжей, так и в клетках позвоночных существует функциональная дивергенция среди субъединиц гетеромерных комплексов только с одной субъединицей, сохраняющей АТР-связывающую функцию. Гетеротримерный комплекс Rlp1-Sws1-Rdl1 участвует в связывании Rhp51 с оцДНК на стадии, предшествующей действию Rhp55-Rhp57 (рис. 3б, 1). Показано, что оба комплекса белков, Rhp55-Rhp57 и Rlp1-Rdl1-Sws1, участвуют в одном и том же пути сборки Rad51-нуклеопротеинового филемента [17, 18].

Известно, что в клетках *S. pombe* существует два независимых параллельных Rhp51-зависимых пути сборки нуклеопротеинового филемента [20, 21], один из которых контролируется Rhp55-Rhp57 и комплексом Rlp1-Rdl1-Sws1, тогда как второй контролируется комплексом Sfr1-Swi5. Когда обе ветви элиминированы (двойная мутация *sfr1Δrhp55Δ*), клетки становятся чувствительны к повреждению ДНК, как и клетки мутанта *rhp51Δ*.

Гетеродимер Swi5-Sfr1 состоит из двух мономеров Swi5 и одного мономера Sfr1. Медиаторный комплекс *S. pombe* Sfr1-Swi5 взаимодействует с Rhp51 *in vivo* и *in vitro* через Sfr1-субъединицу [20, 21] и стимулирует функцию Rhp51. Взаимодействие рекомбиназы Rhp51 с Sfr1 происходит через связывание первого с двумя мотивами PSA на субъединице Sfr1 комплекса Sfr1-Swi5 [22]. По-

вторы PSA блокируют сборку Rhp51-нуклеопротеинового филемента *in vivo*, когда представлены в избытке по отношению к Rhp51.

Два медиаторных пути в клетках *S. pombe* перекрываются друг с другом [21]. Так, повышенная экспрессия гена *sfr1⁺* частично супрессирует нарушения в репарации и клеточной пролиферации у мутантов *rhp55Δ* и *rhp57Δ*. Когда репарация ДЦР ДНК при репликации происходит в условиях делеции гена *rhp55*, запускается механизм контроля клеточного цикла (checkpoint) S-фазы (клеточная элонгация) и повышается экспрессия белка Sfr1, что может частично “спасать” этот дефект. Повышенная экспрессия Sfr1 также частично “спасает” снижение споруляции и жизнеспособности спор *rhp55Δ*. Тот факт, что супрессии нарушений в мейотической рекомбинации не наблюдается, свидетельствует о различных функциях Sfr1 и Rhp55 в мейотической репарации разрывов ДНК. Хотя два медиаторных пути рекомбинационной репарации частично перекрываются и степень нарушения репарации ДНК в мутантах *sfr1Δ* и *rhp55Δ* идентична, некоторые фенотипы соответствующих мутантов значительно отличаются. Во-первых, в отличие от мутанта *rhp55Δ*, который характеризуется замедленным ростом, вытянутостью клеток и измененной морфологией ядерного материала [14], делеция *sfr1⁺* не вызывает видимых эффектов на клеточную пролиферацию/репликацию. Более того, двойной мутант *sfr1Δ rad2Δ* жизнеспособен в отличие от *rhp55Δ rad2Δ* и всех других комбинаций *rad2Δ* с известными в настоящее время

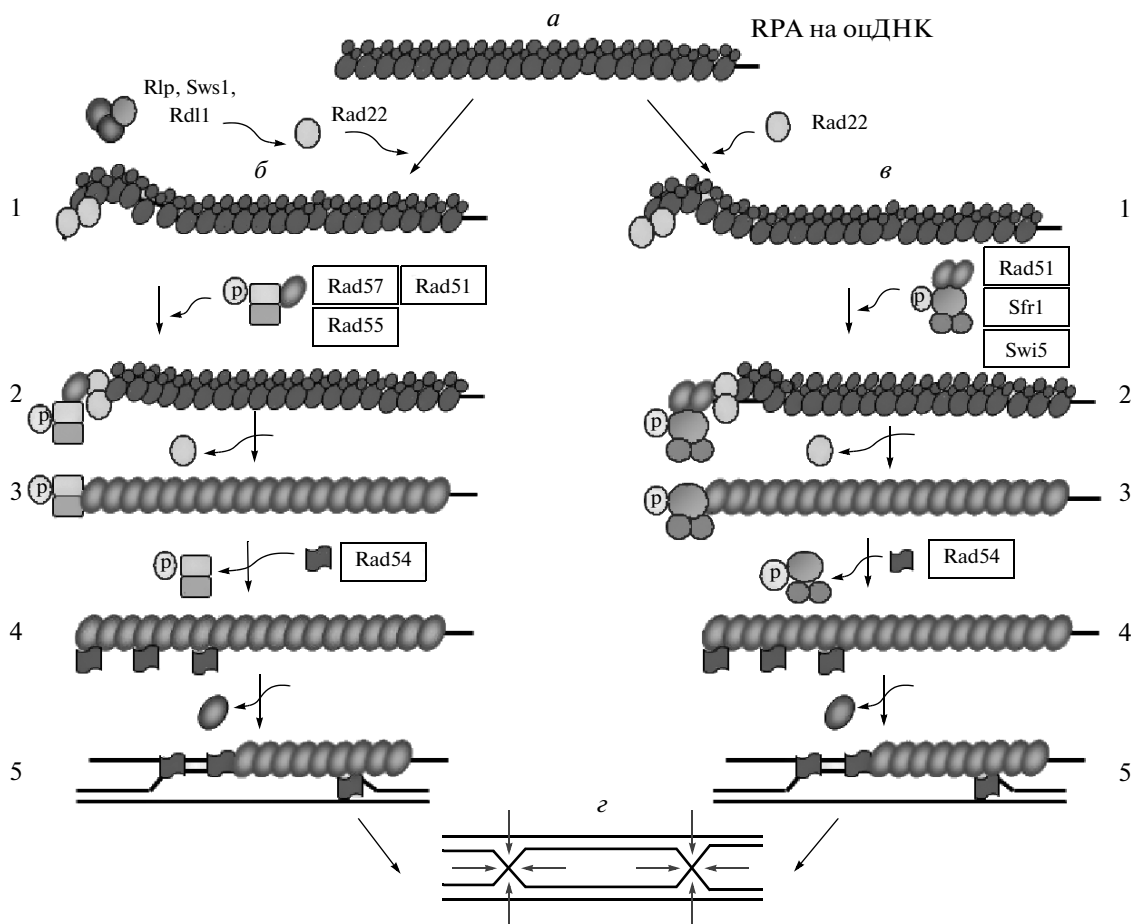


Рис. 3. Механизм рекомбинационной репарации в клетках делящихся дрожжей *S. pombe*. *а* – Одноцепочечные участки ДНК покрываются белком RPA, состоящим из трех субъединиц. *б, в* – Два пути сборки Rhp51-нуклеопротеинового филемента: *б, 1* и *в, 1* – белок Rad22 взаимодействует с RPA, снижая его аффинность к ДНК и облегчая связывание Rhp51 с оцДНК. *б, 2* – Белковый гетеродимер Rhp55-Rhp57 взаимодействует с Rhp51 через субъединицу Rhp57 и мобилизует рекомбиназу к сайтам повреждения; *б, 3* – гетеродимер Rhp55-Rhp57 стабилизирует Rhp51-нуклеопротеиновый филемента. *в, 2* – Медиаторный комплекс Sfr1-Swi5 мобилизует Rhp51 через его связывание с субъединицей Sfr1 к сайтам повреждения ДНК и помогает белку Rhp51 замещать RPA на оцДНК; *в, 3* – гетеродимер Sfr1-Swi5 в присутствии АТФ стабилизирует Rhp51-оцДНК филемента. *б, 4* и *в, 4* – Белок Rad54 связывается с Rhp51 и стабилизирует Rhp51-предсинаптический филемента. *б, 5* и *в, 5* – Белок Rad54 стимулирует инвазию цепи ДНК с помощью Rhp51 и ремоделирует нуклеосомы при перемещении по дулексной ДНК. *г* – Процесс репарации/рекомбинации завершается разрезанием полуиазм Холлидея с последующей миграцией точки ветвления. Фосфорилирование белков показано буквой “P”.

мутациями по генам *RAD52* группы *S. pombe*. Эти данные позволяют предположить, что комплекс Sfr1-Swi5 не участвует непосредственно в репарации поврежденных репликационных вилок, возникающих в клетках *rad2Δ* [23]. Несмотря на отсутствие очевидных дефектов в репликации ДНК, мутант *sfr1Δ* проявляет умеренную чувствительность к высоким дозам гидроксимочевины и камптотецина, блокирующих репликацию ДНК [21].

Возникает вопрос: Sfr1-Swi5-опосредованный путь эволюционно консервативен или специфичен только для *S. pombe*? В клетках *S. cerevisiae* идентифицирован белковый комплекс Sae3-Mei5 как медиатор образования филемента для мейоз-специфичной рекомбиназы Dmc1 [24]. Белки

Sae3 и Mei5, очевидно, представляют собой лишь структурные, но не функциональные гомологи соответственно Swi5 и Sfr1, поскольку мутации в *S. cerevisiae sae3* и *mei5* не приводят к нарушениям в репарации ДНК в митозе. Мутанты *S. pombe swi5Δ* и *sfr1Δ* также характеризуются нарушениями в мейозе и взаимодействуют с Dmc1 *in vivo*. Эти результаты могут указывать на то, что комплекс Swi5-Sfr1 функционирует как медиатор Dmc1. Однако роли Swi5-Sfr1 в митотической и мейотической репарации различны. В клетках позвоночных также идентифицированы и охарактеризованы гомологи *S. pombe* Sfr1 и Swi5, образующие комплекс как *in vivo*, так и *in vitro* [25, 26]. Таким образом, два пути сборки Rad51 (Rhp51)-

нуклеопротеинового филамента, по-видимому, можно считать общей особенностью эукариот.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ КОМПОНЕНТОВ СИСТЕМЫ РЕКОМБИНАЦИОННОЙ РЕПАРАЦИИ В *S. pombe*

К настоящему времени уже получены экспериментальные доказательства функционирования белков рекомбинационной репарации в форме белковых комплексов в клетках как почкующихся дрожжей, так и человека. Анализ белок-белковых взаимодействий показывает, что это утверждение правомерно и для делящихся дрожжей [16]. Найденные типы взаимодействий между белками репарационной рекомбинации в клетках *S. pombe* схематически представлены на рис. 2 и сопоставлены с известными белками *S. cerevisiae*. Указанные белок-белковые взаимодействия совсем не обязательно происходят одновременно, а скорее носят временной и поэтапный характер. Комплексы высококонсервативны, они присутствуют во всех клетках: от дрожжей до клеток животных. Следует также отметить, что, несмотря на общую схему взаимодействий, порядок использования доменов связывания у белков или субъединиц белкового комплекса различен у *S. pombe* и у *S. cerevisiae*, как это продемонстрировано соответственно для комплексов Rhp51-(Rad22-Rti1) и Rhp51-(Rhp57-Rhp55).

МОДЕЛЬ РЕКОМБИНАЦИОННОЙ РЕПАРАЦИИ В *S. pombe*

Первый этап механизма рекомбинационной репарации — экзонуклеолитическая деградация концов ДЦР ДНК и образование выступающих 3'-концов из дуплексной ДНК. Затем запускается репарационный синтез, который в *S. pombe* может происходить с участием двух ферментативных путей: 1) тримерного комплекса MRN (Rad32-Rad50-Nbs1) совместно с Ctp1 и 2) 5'-3'-экзонуклеазы Exo1. Возникающие на 3'-конце однопочечные участки ДНК покрываются тримерным белком RPA (рис. 3а), что мешает последующей нуклеации Rad51-филамента на оцДНК *in vitro*. Ингибиторный эффект RPA на образование Rad51-филамента преодолевается кофакторами Rad51 — белками-медиаторами. Белок Rad22 взаимодействует с RPA, тем самым снижая его аффинность к ДНК и вследствие этого облегчая связывание Rhp51 с оцДНК (рис. 3б, 1 и 3в, 1).

Функция гетеродимера Rhp55-Rhp57 остается до конца не ясной. Белковый комплекс Rhp55-Rhp57 взаимодействует с Rhp51 через субъединицу Rhp57 и мобилизует рекомбиназу к сайтам повреждения (рис. 3б, 2). Полагают, что гетеродимер необходим для стабилизации нуклеопротеино-

го филамента, формируемого при олигомеризации мономеров Rhp51 на оцДНК (рис. 3б, 3).

В параллельном пути образования нуклеопротеинового филамента медиаторный комплекс Sfr1-Swi5 помогает белку Rhp51 замещать RPA на оцДНК в присутствии АТФ (рис. 3в, 2). Гетеродимер Sfr1-Swi5 мобилизует Rhp51 через его связывание с субъединицей Sfr1 к сайтам повреждения ДНК, покрытой белком RPA, что можно обнаружить цитологически *in vivo* как Rad51-репарационные фокусы. Гетеродимер Sfr1-Swi5 для взаимодействия с фракцией свободных молекул Rhp51 использует повторяющиеся участки PSA белка Sfr1. Генетическим и молекулярным анализом показано, что белок Rad22 функционирует в каждом из двух параллельных Rhp51-зависимых способов сборки нуклеопротеинового филамента [27–29]. Рекомбиназа Rhp51, но не медиаторы Rad22 или Sfr1-Swi5, замещает RPA на оцДНК [29]. В присутствии АТФ Sfr1-Swi5 стабилизирует Rhp51-оцДНК филаменты (рис. 3в, 3).

Остается не ясным, почему два медиаторных пути необходимы для эффективной сборки Rhp51-филамента. Одно из возможных объяснений — это наличие различных структурных форм Rhp51-филамента, а также способов его сборки, которые могут быть адаптированы к разным условиям: например, во время репликации одни, а во время репарации разрывов в фазе G₂ другие. Учитывая, что гетеродимер Rhp55-Rhp57 играет значительно более важную роль при репликации ДНК, чем медиатор Sfr1-Swi5, последний, по-видимому, не очень важен в S-фазе клеточного цикла.

Белок Rad54 играет важную роль в рекомбинационной репарации ДЦР ДНК. Это ДНК-зависимая АТРаза, которая принадлежит к семейству хроматин-ремоделирующих белков Swi2/Snf2 [30]. Белок Rad54 в клетках *S. cerevisiae* связывается с Rad51 и стабилизирует Rad51-предсинаптический филамент (рис. 3б, 4 и 3в, 4). Белок Rad54 стимулирует *in vitro* инвазию цепи ДНК с помощью Rad51 и, будучи моторным белком, может ремоделировать нуклеосомы при перемещении по дуплексной ДНК (рис. 3б, 5 и 3в, 5). Известна роль белка Rad54 и после синапса. Rad54 отделяет белок Rad51 от гетеродуплексной ДНК, открывая доступ ДНК-полимеразам к инвазированному 3'-концу ДНК. После синтеза ДНК процесс репарации/рекомбинации завершается разрезанием полухиазм Холлидея, сформированных в результате обмена цепями двух гомологичных хромосом с последующей миграцией точки ветвления (рис. 3г). Все эти процессы могут сопровождаться или не сопровождаться кроссинговером. На пути Swi5-Sfr1 разрезание полухиазм в интермедиате с образованием продуктов кроссинговера происходит с участием эндонуклеаз Mus81 и Eme1 [31]. При этом белки, участвующие в разрезании полухиазм, ко-

торые не сопровождаются кроссинговером, остаются неизвестными. В интермедиатах, возникающих на пути Rhp55-Rhp57, разрезание полухиазм Холлидея с образованием продуктов рекомбинации, не сопровождающихся кроссинговером, происходит с участием хеликазы Rqh1 и топоизомеразы Top3 [31]. Белки, участвующие в сопровождающемся кроссинговером процессе эндонуклеолитического расщепления полухиазм, к настоящему времени неизвестны.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В последние годы становится более видимой взаимосвязь различных компонентов клеточного ответа на индуцированные разрывы ДНК или блокирование репликационного синтеза. Показана связь механизмов контроля клеточного цикла и механизма репарации повреждений ДНК. В клетках эукариот при переходе от фазы G1 к фазе S/G2 механизм негомологичного соединения концов ДНК постепенно уступает место рекомбинационной репарации, именно в S-фазе экспрессия белков рекомбинационной репарации достигает максимального уровня. Ключевыми регуляторами клеточной прогрессии служат циклин-зависимые киназы. В мутантных клетках *S. cerevisiae cdc7* рекомбинационная репарация блокируется в G1-остановленных диплоидных клетках, и даже присутствия гомологичной матрицы ДНК не достаточно для запуска рекомбинационной репарации. В этом случае для репарации ДЦР наиболее эффективен механизм негомологичного соединения концов ДНК [32]. Система регулирования “отношений” между этими двумя репарационными механизмами в клетках делящихся дрожжей остается не изученной. Выявление взаимосвязей между процессами, происходящими в ходе рекомбинационной репарации, — образование выступающих 3'-концов оцДНК, сборка Rhp51-филамента и разрешение полухиазм Холлидея — и процессами контроля клеточного цикла очень важно для понимания как самих механизмов репарации ДНК, так и их роли в поддержании целостности генома.

Авторы благодарят член-корр. РАН, профессора, д.х.н. О.И. Лаврик (Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск) и профессора, д.б.н. Ю.В. Козлова (Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта РАН, Москва) за ценные замечания и комментарии.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (Проект 06-04-01589-а).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Paques F., Haber J.E. 1999. Multiple pathways of recombination induced by double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **63**, 349–404.
2. Shinohara A., Ogawa H., Matsuda Y., Ushio N., Ieko K., Ogawa T. 1993. Cloning of human, mouse and fission yeast recombination genes homologous to *RAD51* and *recA*. *Nat. Genet.* **4**, 239–243.
3. Mimitou E.P., Symington L.S. 2011. DNA end resection — unraveling the tail. *DNA Repair.* **10**, 344–348.
4. Farah J.A., Cromie G.A., Smith G.R. 2009. Ctp1 and exonuclease 1, alternative nucleases regulated by the MRN complex, are required for efficient meiotic recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **106**, 9356–9361.
5. Bianco P.R., Tracy R.B., Kowalczykowski S.C. 1998. DNA strand exchange proteins: a biochemical and physical comparison. *Front. Biosci.* **3**, 570–603.
6. Zaitseva E.M., Zaitsev E.N., Kowalczykowski S.C. 1999. The DNA binding properties of *Saccharomyces cerevisiae* Rad51 protein. *J. Biol. Chem.* **274**, 2907–2915.
7. Ogawa T., Yu X., Shinohara A., Egelman E.H. 1993. Similarity of the yeast *RAD51* filament to the bacterial RecA filament. *Science.* **259**, 1896–1899.
8. Conway A.B., Lynch T.W., Zhang Y., Fortin G.S., Fung C.W., Symington L.S., Rice P.A. 2004. Crystal structure of a Rad51 filament. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **11**, 791–796.
9. Sung P. 1994. Catalysis of ATP-dependent homologous DNA pairing and strand exchange by yeast *RAD51* protein. *Science.* **265**, 1241–1243.
10. Wold M.S. 1997. Replication protein A: a heterotrimeric, single-stranded DNA-binding protein required for eukaryotic DNA metabolism. *Annu. Rev. Biochem.* **66**, 61–92.
11. Lee S.E., Moore J.K., Holmes A., Umez K., Kolodner R.D., Haber J.E. 1998. *Saccharomyces* Ku70, mre11/rad50 and RPA proteins regulate adaptation to G2/M arrest after DNA damage. *Cell.* **94**, 399–409.
12. Wold M.S. 1997. Replication protein A: a heterotrimeric, single-stranded DNA-binding protein required for eukaryotic DNA metabolism. *Annu. Rev. Biochem.* **66**, 61–92.
13. Kurokawa Y., Murayama Y., Haruta-Takahashi N., Urabe I., Iwasaki H. 2008. Reconstitution of DNA strand exchange mediated by Rhp51 recombinase and two mediators. *PLoS Biology.* **6**, 836–848.
14. Khasanov F.K., Savchenko G.V., Bashkirova E.V., Korolev V.G., Heyer W.D., Bashkirov V.I. 1999. A new recombinational DNA repair gene from *Schizosaccharomyces pombe* with homology to *Escherichia coli* RecA. *Genetics.* **152**, 1557–1572.
15. Tsutsui Y., Morishita T., Iwasaki H., Toh H., Shinagawa H. 2000. A recombination repair gene of *Schizosaccharomyces pombe*, *rhp57*, is a functional homolog of the *Saccharomyces cerevisiae* *RAD57* gene and is phylogenetically related to the human *XRCC3* gene. *Genetics.* **154**, 1451–1461.

16. Tsutsui Y., Khasanov F.K., Shinagawa H., Iwasaki H., Bashkirov V.I. 2001. Multiple interactions among the components of the recombinational DNA repair system in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics*. **159**, 91–105.
17. Khasanov F.K., Salakhova A.F., Chepurnaja O.V., Korolev V.G., Bashkirov V.I. 2004. Identification and characterization of the *rlpI⁺*, the novel Rad51 paralog in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *DNA Repair*. **3**, 1363–1374.
18. Martin V., Chahwan C., Gao H., Blais V., Wohlschlegel J., Yates J.R., McGowan C.H., Russell P. 2006. Sws1 is a conserved regulator of homologous recombination in eukaryotic cells. *EMBO J.* **25**, 2564–2574.
19. Wiese C., Hinz J.M., Tebbs R.S., Nham P.B., Urbin S.S., Collins D.W., Thompson L.H., Schild D. 2006. Disparate requirements for the Walker A and B ATPase motifs of human RAD51D in homologous recombination. *Nucl. Acids Res.* **34**, 2833–2843.
20. Akamatsu Y., Dziadkowiec D., Ikeguchi M., Shinagawa H., Iwasaki H. 2003. Two different Swi5-containing protein complexes are involved in mating-type switching and recombination repair in fission yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **100**, 15770–15775.
21. Салахова А.Ф., Савченко Г.В., Хасанов Ф.К., Чепурная О.В., Королев В.Г., Башкиров В.И. 2005. Ген *dds20⁺* контролирует новый Rad51Sp-зависимый путь рекомбинационной репарации в *Schizosaccharomyces pombe*. *Генетика*. **41**, 736–745.
22. Хасанова О.С., Башкиров В.И., Хасанов Ф.К. 2010. Картирование сайта взаимодействия между рекомбинационными белками в дрожжевых клетках. *Докл. Акад. Наук*. **434**, 242–244.
23. Waga S., Stillman B. 1998. The DNA replication fork in eukaryotic cells. *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 721–751.
24. Tsubouchi H., Roeder G.S. 2004. The budding yeast *mei5* and *sae3* proteins act together with *dmcl1* during meiotic recombination. *Genetics*. **168**, 1219–1230.
25. Akamatsu Y., Jasin M. 2010. Role for the mammalian Swi5-Sfr1 complex in DNA strand break repair through homologous recombination. *PLoS Genetics*. **6**, 1–11.
26. Yuan J., Chen J. 2011. The role of the human SWI5-MEI5 complex in homologous recombination repair. *J. Biol. Chem.* **286**, 9888–9893.
27. Doe C.L., Osman F., Dixon J., Whitby M.C. 2004. DNA repair by a Rad22-Mus81-dependent pathway that is independent of Rhp51. *Nucl. Acids Res.* **32**, 5570–5581.
28. Osman F., Dixon J., Barr A.R., Whitby M.C. 2005. The F-box DNA helicase Fbh1 prevents Rhp51-dependent recombination without mediator proteins. *Mol. Cell Biol.* **25**, 8084–8096.
29. Kurokawa Y., Murayama Y., Haruta-Takahashi N., Urabe I., Iwasaki H. 2008. Reconstitution of DNA strand exchange mediated by Rhp51 recombinase and two mediators. *PLoS Biol.* **6**, e88.
30. Li X., Heyer W.D. 2009. RAD54 controls access to the invading 3'-OH end after RAD51-mediated DNA strand invasion in homologous recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucl. Acids Res.* **37**, 638–646.
31. Hope J.C., Cruzata L.D., Duvshani A., Mitsumoto J., Maftahi M., Freyer G.A. 2007. Mus81-Eme1-dependent and -independent crossovers form in mitotic cells during double-strand break repair in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol. Cell. Biol.* **27**, 3828–3838.
32. Kim J.M., Yamada M., Masai H. 2003. Functions of mammalian Cdc7 kinase in initiation/monitoring of DNA replication and development. *Mutat. Res.* **532**, 29–40.