

РЕПАРАЦИЯ ПОВРЕЖДЕНИЙ ДНК, ВЫЗВАННЫХ ГАММА-ИЗЛУЧЕНИЕМ,  
У ОДНОКЛЕТОЧНОЙ ЗЕЛЕННОЙ ВОДОРОСЛИ *CHLAMYDOMONAS REINHARDTII*И.А. Сизова<sup>1,2</sup>, И.Н. Суслова, В.И. Шалгуев, Н.Г. Соболева, В.Н. Вербенко<sup>1,2</sup><sup>1</sup>Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова Национального исследовательского центра  
«Курчатовский институт», Гатчина, Россия<sup>2</sup>Курчатовский Геномный центр-ПИЯФ, Гатчина, Россия

Известно, что гамма-излучение прямо или косвенно вызывает одно- и двухцепочечные разрывы ДНК (ДЦР) и при высоких дозах радиации приводит к повреждению клеточных структур, нестабильности генома и гибели клетки. Внесенные в геном ДЦР могут восстанавливаться посредством гомологичной рекомбинации (HR), канонического нехомологичного соединения концов (сNHEJ) и альтернативного соединения концов (altEJ/TMEJ). Целью нашей работы является выяснение путей репарации ДЦР, вызванных гамма-излучением, у популярного модельного и экологически значимого организма – микроводоросли *Chlamydomonas reinhardtii*. В работе были использованы сконструированные нами нуль-мутанты *ku80*, *ku70* по ключевым генам пути сNHEJ и *polQ* пути altEJ/TMEJ (Greiner et al., 2017; Sizova et al., 2021). Проведенный нами анализ спектра мутаций, индуцированных с использованием CRISPR-SpCas9 редактирования, показал, что в клетках дикого типа около 70 % мутаций являлись 1 – 2 нуклеотидными вставками / делециями / обменами характерными для репарации посредством NHEJ, а около 30 % мутаций представляли делеции между участками микрогомологии и “шаблонные” вставки специфичные для репарации посредством и altEJ/TMEJ. Таким образом, в мутагенной репарации уникального ДЦР, созданного CRISPR-SpCas9, принимали участие пути сNHEJ и altEJ/TMEJ, причем вклад пути NHEJ доминировал. Далее мы изучили чувствительность штаммов дикого и мутантного типов к антибиотику зеоцину (Zc), который обладает радиомиметическими свойствами и вызывает множественные ДЦР, количество которых зависит от его концентрации (Chankova et al 2007). Мы обнаружили, что репарационные мутанты были значительно чувствительней к действию Zc, чем клетки дикого типа. Причем клетки *polQ* проявляли более высокую чувствительность к антибиотику, чем клетки *ku80* или *ku70*, что указывало на доминирующую роль пути altEJ/TMEJ в репарации повреждений ДНК, вызванных действием Zc. Анализ чувствительности мутантов к гамма-излучению в диапазоне доз 0 – 100 Gy подтвердил более высокую чувствительность клеток *polQ* к множественным повреждениям ДНК по сравнению с клетками *ku80*, *ku70* и диким типом. Полученные результаты показывают, что выбор доминирующего пути репарации ДЦР может зависеть от степени повреждения ДНК, и при индукции множественных ДЦР в геноме, вероятно, связан с активацией пути altEJ/TMEJ. Для проверки этого предположения будет проанализирован спектр мутаций, индуцированных гамма-излучением у штаммов дикого типа и мутантов *ku80*, *ku70*, *polQ*. В настоящее время с использованием гамма-излучения мы получаем устойчивые к 2-фтораденину и 5-фториндолу мутанты, у которых инактивированы гены *APT* и *MAA7*, соответственно. Анализ нуклеотидных последовательностей аллелей *apt* и *maat7* выявит специфические “нуклеотидные подписи” путей NHEJ и TMEJ и их вклад в репарацию ДЦР и индуцированный мутагенез.

**Работа выполнена как часть программы Курчатовского Геномного центра “Курчатовский Геномный центр-ПИЯФ – ПИЯФ” (соглашение No. 075–15–2019–1663)**

## Литература

- Sizova I., Simon Kelterborn S., Verbenko V., Kateriya S., Hegemann P. *Chlamydomonas* POLQ is necessary for CRISPR/Cas9-mediated gene targeting. *G3 Genes/Genomes/Genetics*, 2021, accepted, doi.org/10.1093/g3journal/jkab114
- Greiner A, Kelterborn S, Evers H, Kreimer G, Sizova I, Hegemann P. Targeting of Photoreceptor Genes in *Chlamydomonas reinhardtii* via Zinc-Finger Nucleases and CRISPR/Cas9. *Plant Cell*. 2017, 29(10):2498–2518.
- Chankova SG, Dimova E, Dimitrova M, Bryant PE. Radiat Environ Biophys. Induction of DNA double-strand breaks by zeocin in *Chlamydomonas reinhardtii* and the role of increased DNA double-strand breaks rejoining in the formation of an adaptive response. 2007, 46(4):409–16.