

*На правах рукописи*

ЧЕРНЕНКОВ

Андрей Юрьевич

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ  
ФУНКЦИЙ ГЕНА *HSM3* ДРОЖЖЕЙ *Saccharomyces cerevisiae***

03.02.07 – Генетика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург

2013

Работа выполнена в лаборатории генетики эукариот Отделения молекулярной и радиационной биофизики Федерального государственного бюджетного учреждения «Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова» Национального исследовательского центра «Курчатовский институт», г. Гатчина.

Научный руководитель:

**Королёв Владимир Геннадиевич**  
доктор биологических наук,  
заведующий лабораторией генетики эукариот,  
руководитель Отделения молекулярной и  
радиационной биофизики ФГБУ «ПИЯФ»,  
г. Гатчина.

Официальные оппоненты:

**Журавлёва Галина Анатольевна**  
доктор биологических наук, профессор,  
доцент кафедры генетики и селекции  
Биолого-почвенного факультета  
Санкт-Петербургского государственного  
университета,

**Сойдла Тыну Рихович**  
доктор биологических наук, старший научный  
сотрудник, ведущий научный сотрудник,  
руководитель группы генетики митоза ФГБУН  
«Институт цитологии РАН», г. Санкт-Петербург.

Ведущая организация:

ФГБУН «Институт общей генетики  
им. Н.И. Вавилова РАН», г. Москва.

Защита состоится «\_\_» \_\_\_\_\_ 20\_\_ года в \_\_\_\_\_ часов на заседании совета Д 212.232.12 по защите докторских и кандидатских диссертаций при Санкт-Петербургском государственном университете по адресу: 199034, Санкт-Петербург, Университетская набережная, д.7-9, СПбГУ, Биолого-почвенный факультет, кафедра генетики и селекции.  
тел. 8(812)328-15-90, e-mail: genetics@bio.pu.ru

С диссертацией можно ознакомиться  
в Научной библиотеке им. М. Горького Санкт-Петербургского государственного университета.

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 20\_\_ года

Ученый секретарь Диссертационного совета  
доктор биологических наук

Л.А.Мамон

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы.** Дрожжи являются удобным модельным объектом для изучения мутационного и репарационного процессов в клетке, а также для изучения процессов модификации и ремоделирования структуры хроматина. Еще более важен факт, что результаты, полученные в экспериментах на клетках дрожжей, могут быть экстраполированы на такой сложный организм как человеческий. Это перспективно с точки зрения того, что показана взаимосвязь многих генетических и онкологических заболеваний с изменениями структуры и укладки хроматина, а также его функций.

Ранее хроматин рассматривался как статическая структура, необходимая для упорядоченной компактизации генетического материала. Хотя упаковка ДНК и ее закрытость являются важными функциями хроматина, тем не менее, в настоящее время стало очевидным, что структурные единицы хроматина – нуклеосомы – представляют собой динамичные инструктивные частицы, участвующие практически во всех хромосомных процессах. Это достигается через высоколокальные изменения в структуре хроматина. Свойства нуклеосом могут изменяться вследствие посттрансляционных химических модификаций входящих в их состав гистоновых белков. К модификациям гистонов относят, к примеру, ацетилирование, метилирование, фосфорилирование и другие. Модификации структуры хроматина служат для регуляции различных клеточных процессов, включая транскрипцию, репарацию, репликацию.

Комбинированное действие гистон-модифицирующих ферментов, действующих на определенный район хроматина, создает шаблон модификации гистонов *in vivo*. Существует ряд ферментов, модифицирующих гистоны, но каждый фермент обладает уникальным предпочтением к определенным сайтам и районам хромосомы. Нацеливание различных ферментов на специфический район генома является важным механизмом для создания уникальных паттернов модификаций. Иногда уникальность модификации достигается комбинированным действием модификатора и демодификатора. Модификации гистонов играют значительную роль в обеспечении устойчивости клеток к агентам, повреждающим ДНК. Исследования последнего десятилетия показали, что в дополнение к белкам, которые прямо осуществляют энзиматические реакции репарации ДНК, существуют факторы, которые организуют специализированные хроматиновые структуры вокруг повреждения ДНК и могут облегчать обнаружение и репарацию этих повреждений. Как хроматин-ремоделирующие, так и гистон-модифицирующие ферменты изменяют топологию хроматина в ответ на повреждения ДНК.

В лаборатории генетики эукариот Петербургского института ядерной физики была получена коллекция мутантов *hsm* (от англ. high spontaneous mutagenesis), отличающихся повышенной частотой спонтанного мутагенеза. Интересным представлялось изучить функции открытых генов в процессах репарации и мутагенеза у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, а также установить их роль в процессах модификации структуры хроматина. Данная работа посвящена генетическому и молекулярно-биологическому анализу функций гена *HSM3* и его продукта.

**Цель исследования:** молекулярно-генетическими методами изучить функции гена *HSM3* дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. В ходе исследования решались следующие **задачи**:

1. выяснить роль гена *HSM3* в контроле различных путей репарации;
2. установить влияние мутаций в гене *HSM3* на стабильность D-петли;
3. установить функции C-концевого домена белка Hsm3;
4. изучить взаимодействие гена *HSM3* с генами, контролирующими состояние хроматина.

**Научная новизна работы.** В ходе работы установлено участие гена *HSM3* в системах пострепликативной и рекомбинационной репарации у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Показано влияние продукта гена *HSM3* на стабильность главного интермедиата указанных выше путей репарации – D-петлю. Впервые генетическими методами была установлена доменная структура белка Hsm3 и показано участие C-концевого домена данного белка в контроле спонтанного и индуцированного мутагенеза. Показано также взаимодействие гена

*HSM3* с генами, контролирующими состояние хроматина, и его опосредованное влияние на пул дезоксирибонуклеотидов в клетке. Показано участие белка Hsm3 в качестве субъединицы в гистонацетилазном комплексе НАТ-В/NuB4, осуществляющем ацетилирование гистона H4.

**Теоретическая и практическая ценность работы.** Проведенное в работе исследование позволило более точно охарактеризовать функции гена *HSM3*, а также установить его роль и роль белка Hsm3 в контроле двух важнейших процессов репарации у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*: рекомбинационной и пострепликативной. Полученные данные позволяют также говорить о гене *HSM3* как об одном из ключевых игроков в процессах модификации структуры хроматина.

Материалы и экспериментальные данные, полученные в диссертационной работе, могут быть использованы для чтения лекций по молекулярно-генетическим курсам в научных и образовательных институтах.

**Основные положения, выносимые на защиту:**

1. Ген *HSM3* участвует в контроле гомологичной рекомбинационной и пострепликативной репарации у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*.
2. Мутации в гене *HSM3* дестабилизируют D-петлю.
3. Продукт гена *HSM3* имеет доменную структуру. С-концевой домен белка Hsm3 ответственен за мутагенез.
4. Белок Hsm3 принимает участие в работе гистон ацетилазного комплекса НАТ-В / NuB4.

**Личный вклад автора.** Все исследования в ходе данной работы проводились лично автором, за исключением: конструирование плазмиды pFDV14 – м.н.с. ЛГЭ ОМБР ПИЯФ Фёдоров Д.В.; получение фага-помощника и установление титра фага – н.с. ЛГЭ ОМБР ПИЯФ Евстюхина Т.А.; секвенирование аллелей *hsm3-1* и *hsm3::URA3* – с.н.с. ЛГЭ ОМБР ПИЯФ Пешехонов В.Т..

**Апробация работы.** Работа была представлена на Конференции молодых ученых, аспирантов и студентов по молекулярной биологии и генетике, посвященной 120-летию со дня рождения Н.И. Вавилова (Киев, Украина, 2007); Международном молодежном научном форуме «Ломоносов–2009» (Москва, Россия, 2009); XIII Международном Симпозиуме студентов-биологов Европы (Казань, Россия, 2009); III Всероссийском с международным участием Конгрессе студентов и аспирантов-биологов «Симбиоз-Россия 2010» (Нижний Новгород, Россия, 2010); I Всероссийской с международным участием Школе-конференции молодых ученых «Современные проблемы микробиологии, иммунологии и биотехнологии» (Пермь, Россия, 2011); IV Съезде биофизиков России (Нижний Новгород, Россия, 2012); VI Всероссийской конференции «Стратегия взаимодействия микроорганизмов с окружающей средой» (Саратов, Россия, 2012); семинарах ОМБР ПИЯФ (2006–2012 гг.).

**Публикации.** По материалам работы опубликовано 4 статьи в рецензируемых журналах.

**Объем и структура диссертации.** Диссертация изложена на 139 машинописных страницах и содержит 49 рисунков и 12 таблиц. Работа состоит из списка принятых сокращений, оглавления, введения, глав «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты», «Обсуждение», выводов, списка работ, опубликованных по теме диссертации, списка литературы, включающего 149 источников, приложений.

**Финансовая поддержка работы.** Работа поддержана грантами Российского фонда фундаментальных исследований: 04-04-48179-а, 07-04-00256-а, 12-04-01467-а, 12-04-31386-мол\_а. Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации в рамках ГК № 8131 ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России на 2009–2013 годы» и ГК № 11.519.11.2002 ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007–2013 годы» с использованием оборудования ЦКП «Аналитический центр нано- и биотехнологий ГОУ СПбГПУ».

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснована актуальность темы диссертации, сформулированы цель и задачи исследования, показано научно-практическое значение работы.

### 1. Обзор литературы

Дана характеристика объекта исследования, обобщены современные представления о системах репарации у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, рассмотрены актуальные вопросы, касающиеся структурной организации хроматина и его посттрансляционных модификаций, в частности – ацелирования гистонов. Показан широкий спектр функций исследуемого гена и его продукта: участие в сборке протеасомного комплекса, контроль репарационных процессов, взаимодействие с белками-модификаторами структуры хроматина.

### 2. Материалы и методы

Приведены генотипы штаммов дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, а также конструкции плазмид, использованных для разрушения дрожжевых генов. Указаны составы питательных сред и условия культивирования штаммов. Описаны основные методы работы с дрожжевыми клетками, методы учета летальности и частот возникновения индуцированных и спонтанных мутаций, методы трансформации клеток, методы выделения и очистки ДНК, статистические методы обработки данных.

### 3. Результаты и обсуждение

#### 3.1. Характеристика мутантных аллелей гена *HSM3*

Сконструированы мутантные аллели гена *HSM3*, установлена природа мутаций: *hsm3-1* – мутация, затрагивающая семь нуклеотидов на С-конце гена; *hsm3::URA3* – на С-концевом участке белка Hsm3 отсутствуют 56 аминокислот; *hsm3Δ* – полное удаление рамки гена путем вставки канамициновой кассеты; *hsm3Δ[HSM3]* – наличие плазмидной копии гена для изучения сверхэкспрессии белка Hsm3 под индуцибельным галактозным промотором.

#### 3.2. Тест чувствительности к повышенной температуре мутантных аллелей гена *HSM3*

Был проведен анализ температурной чувствительности (ts) мутантов *hsm3-1*, *hsm3::URA* и *hsm3Δ* для учета влияния мутаций в С-концевом домене белка Hsm3 на возникновение ts-фенотипа. При культивировании при +37<sup>0</sup>С штаммов *hsm3-1* и *hsm3::URA* они не проявили чувствительности к повышенной температуре, и показатели мутагенеза и выживаемости для них статистически близки к показателям, полученным при культивировании в стандартных условиях (+30<sup>0</sup>С). В то же время мутант *hsm3Δ* оказался термочувствительным. Таким образом, нами было сделано заключение, что мутации в С-концевом домене не оказывают влияния на появление ts-фенотипа.

#### 3.3. Влияние мутаций в гене *HSM3* на спонтанный мутагенез

В Табл. 1 представлены данные учета скорости возникновения спонтанных мутаций канаванин-устойчивости ( $CAN^S \rightarrow CAN^R$ ) у мутантных аллелей гена *HSM3*, измеренные с помощью флукуационного теста (метод медиан Коулсона-Ли, 1949) для учета быстрого репликативного мутагенеза, и методом упорядоченного посева (ленинградский тест; метод Хромова-Борисова, 1975) для учета медленного репаративного мутагенеза.

В случае если исследуемый ген не имеет отношения к контролю любой из репарационных систем, то частоты спонтанного мутирования для исследуемого штамма, измеренные обоими методами, будут статистически совпадать. Если же ген участвует в работе систем репарации, то частоты спонтанных мутаций будут статистически различными. Данные, полученные в результате применения обоих методов к мутантам по исследуемым генам, позволяют сделать вывод о влиянии мутаций в этих генах на эффективность и скорость репарации, а также обосновать по характеру установленного взаимодействия участие исследуемого гена в контроле работы репарационных систем.

Делеция гена *HSM3* не приводит к статистически значимому изменению уровня репликативного спонтанного мутагенеза, однако уровень репаративного мутагенеза у данного мутанта был более чем в два раза выше по сравнению с клетками дикого типа. Частота репликативного спонтанного мутагенеза у мутанта *hsm3-1* выше примерно в два раза, а

репаративного – в пять раз, по сравнению с клетками дикого типа. Частоты спонтанных мутаций у мутанта *hsm3::URA3*, измеренные во флуктуационном тесте и методом упорядоченного посева, статистически совпадают с частотами спонтанного мутагенеза у мутанта *hsm3-1*. Разницу в уровнях мутагенеза для штаммов *hsm3Δ* и *hsm3-1 / hsm3::URA3* в случае упорядоченного посева можно объяснить тем, что белок Hsm3 работает в комплексе с другими белками, которые частично могут компенсировать его функции при его повреждении или отсутствии в клетке. Данные согласуются с полученными ранее в [Fedorova *et al.*, 2004].

Таблица 1. Частоты возникновения спонтанных мутаций канаванин-устойчивости  $CAN^S \rightarrow CAN^R$  у штаммов *ДТ*, *hsm3-1*, *hsm3::URA3*, *hsm3Δ*, *ДТ[HSM3]* и *hsm3[HSM3]*

Штамм	Флуктуационный тест, $\times 10^{-7}$	Упорядоченный посев, $\times 10^{-7}$
<i>ДТ</i>	$3,0 \pm 0,3$	$3,2 \pm 0,7$
<i>hsm3-1</i>	$5,0 \pm 0,3$	$15,8 \pm 0,5$
<i>hsm3::URA3</i>	$6,7 \pm 0,3$	$14,9 \pm 3,5$
<i>hsm3Δ</i>	$3,2 \pm 0,3$	$7,4 \pm 1,0$
<i>ДТ[HSM3]</i>	$7,6 \pm 0,3$	$16,8 \pm 2,3$
<i>hsm3[HSM3]</i>	$66,8 \pm 8,7$	$151,4 \pm 19,7$

Сверхэкспрессия химерного белка в штамме *hsm3[HSM3]* с полностью делетированной хромосомной копией гена *HSM3* привела к резкому увеличению темпа репликативного спонтанного мутагенеза более чем в 20 раз и репаративного мутагенеза в 50 раз. Таким образом, установлено, что С-концевой участок белка Hsm3 принимает активное участие в контроле спонтанного мутагенеза у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. При этом наблюдается строгая зависимость мутаторного эффекта от количества белка.

#### 3.4. Влияние мутаций *hsm3* на выживаемость клеток при УФ облучении

Из данных, приведенных на Рис. 1, видно, что полная делеция гена *HSM3* и мутации, затрагивающие только С-конец этого гена, не сказываются в заметной степени на резистентности клеток к УФ лучам. В случае сверхэкспрессии белка Hsm3 значения выживаемости для всех изученных штаммов (*ДТ*, *hsm3-1*, *hsm3::URA*, *hsm3Δ*, *ДТ[HSM3]* и *hsm3Δ[HSM3]*) статистически не отличались от представленных на Рис. 1. Нами было подмечено лишь незначительное снижение скорости роста штаммов *ДТ[HSM3]* и *hsm3Δ[HSM3]*.

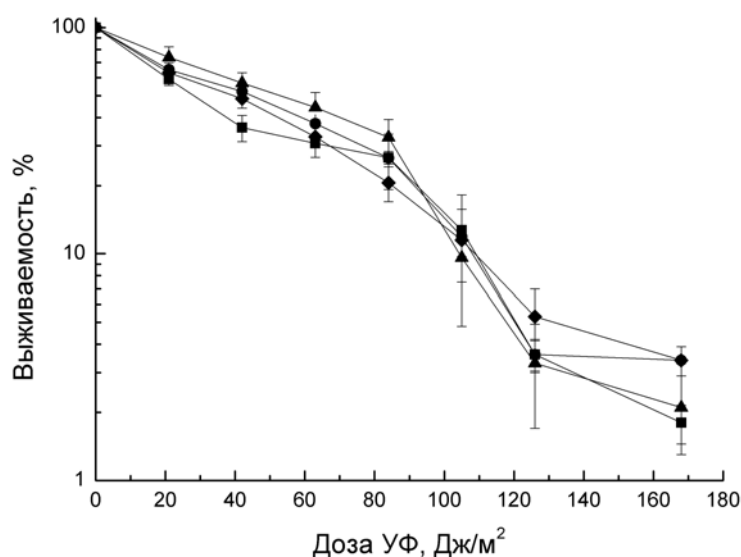


Рисунок 1. Выживаемость под воздействием УФ лучей у штаммов: (-■-) – *ДТ*, (-◆-) – *hsm3-1*, (-●-) – *hsm3::URA* и (-▲-) – *hsm3Δ*

### 3.5. Роль мутаций *hsm3* в УФ индуцированном мутагенезе

Наибольшим уровнем УФ индуцированного мутагенеза (Рис. 2) отличались штаммы с полной делецией гена *hsm3Δ* и мутацией *hsm3-1*. Клетки штамма *hsm3::URA3* показали промежуточный уровень УФ мутагенеза: выше, чем у дикого типа, но ниже, чем у *hsm3-1* и *hsm3Δ*.

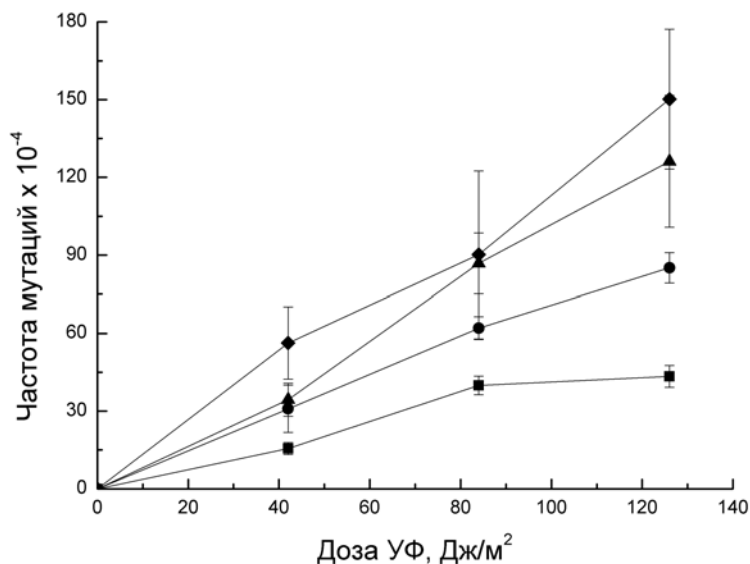


Рисунок 2. Частота мутаций по пяти локусам *ADE4-ADE8*, индуцированных УФ лучами, у штаммов: (-■-) – ДТ, (-◆-) – *hsm3-1*, (-●-) – *hsm3::URA3* и (-▲-) – *hsm3Δ*

Частоты УФ индуцированного мутагенеза для штамма дикого типа, как содержащего плазмиду с геном *HSM3*, так и без нее, статистически не отличались. Частоты УФ индуцированных мутаций у штаммов *hsm3Δ* и *hsm3Δ[HSM3]* статистически значимо выше, чем у штамма дикого типа. Сверхэкспрессия белка Hsm3 в штамме *hsm3Δ[HSM3]* полностью подавляла повышенный УФ мутагенез, обусловленный делеционной мутацией *hsm3Δ* (Рис. 3).

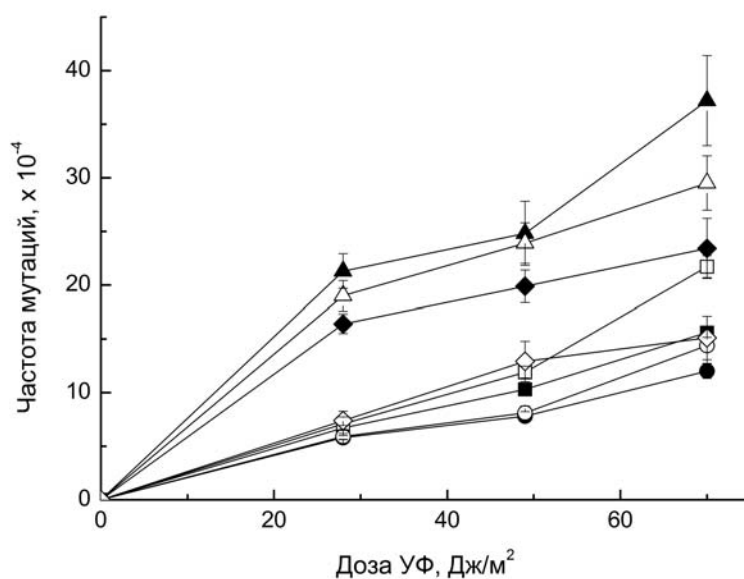


Рисунок 3. Частота мутаций по пяти локусам *ADE4-ADE8*, индуцированных УФ лучами, у штаммов: (-■-) – ДТ, (-□-) – ДТ (сверхэкспрессия), (-●-) – ДТ[*HSM3*], (-○-) – ДТ[*HSM3*] (сверхэкспрессия), (-▲-) – *hsm3Δ*, (-△-) – *hsm3Δ* (сверхэкспрессия), (-◆-) – *hsm3Δ*[*HSM3*], (-◇-) – *hsm3Δ*[*HSM3*] (сверхэкспрессия)

### 3.6. Качественный тест чувствительности к повышенной температуре мутантных аллелей гена *HSM3*

Был проведен анализ температурной чувствительности (ts) мутантов *hsm3-1*, *hsm3::URA* и *hsm3Δ* для учета влияния мутаций в С-концевом домене белка Hsm3 на возникновение ts-фенотипа. При культивировании при +37<sup>0</sup>С штаммов *hsm3-1* и *hsm3::URA* они не проявили чувствительности к повышенной температуре, и показатели мутагенеза и выживаемости для них статистически близки к показателям, полученным при культивировании в стандартных условиях (+30<sup>0</sup>С). В то же время мутант *hsm3Δ* оказался термочувствительным. Таким образом, нами было сделано заключение, что мутации в С-концевом домене не оказывают влияния на ts-фенотип.

### 3.7. Участие белка Hsm3 в репарационных процессах у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*

Было изучено взаимодействие мутаций *hsm3* с мутациями в ключевых генах системы нуклеотидной эксцизионной репарации (NER): *rad1*, *rad2*, *rad4* и *rad14*. Для указанных выше одиночных мутантов и полученных двойных мутантов, содержащих мутацию *hsm3*, были поставлены опыты по учету УФ-индуцированного мутагенеза и выживаемости штаммов при УФ облучении, также была поставлена серия опытов по учету спонтанных мутаций канаванин-устойчивости в процессе быстрого репликативного (флуктуационный тест) и медленного репаративного (упорядоченный посев) мутагенеза. Результаты согласуются с данными, полученными ранее [Fedorova *et al.*, 2004]. Также было изучено взаимодействие мутаций *hsm3* с мутациями в ключевых генах системы коррекции ошибочно спаренных оснований (KOCO) у дрожжей: *pms1* и *msh2*. Данные по учету выживаемости, УФ-индуцированного и спонтанного мутагенеза согласуются с данными, полученными в [Fedorova *et al.*, 2004].

### 3.8. Взаимодействие гена *HSM3* с генами, контролирующими пострепликативную репарацию у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*

Начальный этап пострепликативной репарации (ППР) контролируется ферментативным комплексом Rad6-Rad18. Далее процесс разделяют на четыре ветви. Одна из них контролируется геном *RAD30*, который кодирует полимеразу Polη – уникальную среди эукариотических полимераз по своей способности осуществлять эффективный и безошибочный синтез через повреждения (TLS); инактивация Polη в клетках дрожжей приводит к повышенному УФ мутагенезу. Вторая ветвь ППР контролируется геном *REV3*, который кодирует каталитическую субъединицу ДНК полимеразы Polζ, осуществляющую ошибочный обход повреждений, что, как правило, сопровождается мутагенезом. Третья ветвь ППР, контролируемая генами *RAD5*, *MMS2* и *UBC13*, обеспечивает обход повреждения, временно переключая синтез с поврежденной нити на сестринскую хроматиду. Этот процесс может происходить путем изомеризации репликативной вилки, генерируемой белком Rad5. Ген *SRS2* был открыт как супрессор УФ чувствительности мутантов *rad6* и *rad18*. Геликаза Srs2 играет важную роль в создании субстратов для белка Rad5. Четвертая ветвь – рекомбинационная репарация, контролируемая генами эпистатической группы *RAD52*.

Штаммы *rev3*, *rad18* и *srs2* проявили высокую чувствительность к летальному действию УФ лучей, мутант *mms2* показал промежуточную чувствительность. Двойные мутанты *rev3hsm3*, *rad18hsm3*, *mms2hsm3*, *srs2hsm3* сохраняют высокий уровень УФ чувствительности, свойственный одиночным радиочувствительным мутантам. Однако следует отметить, что введение мутации *hsm3*, как правило, слабо повышает устойчивость двойных мутантов.

Наличие неповрежденного гена *REV3* абсолютно необходимо для возникновения УФ индуцированных мутаций. Из данных, представленных на Рис. 4, следует, что индуцированный мутагенез практически отсутствует у штамма *rev3*. Такой же низкий уровень мутагенеза наблюдался у двойного мутанта *rev3hsm3*. Таким образом, можно утверждать, что гены *HSM3* и *REV3* работают на одном пути пострепликационной репарации. Эпистатический (по *rev3*) характер взаимодействия между данными мутациями позволил выдвинуть предположение о том, что мутации *hsm3* ухудшают эффективность работы безошибочного пути пострепликативной репарации, направляя предмутационные интермедиаты на склонный к ошибкам путь синтеза через повреждения (TLS).



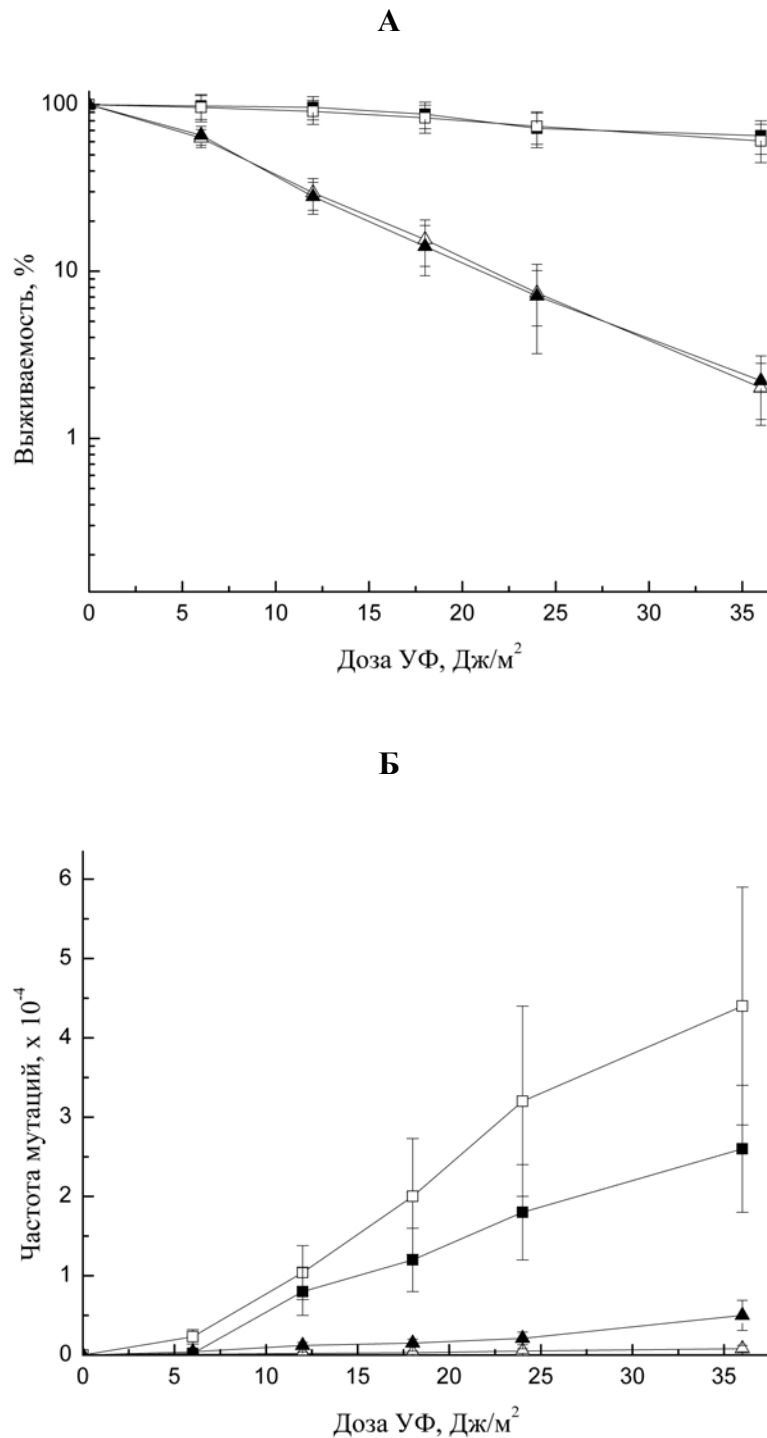


Рисунок 4. (А) Выживаемость и (Б) мутагенез по 5 *ADE*-локусам под действием УФ лучей у штаммов: (-■-) – *ДТ*, (-□-) – *hsm3-1*, (-Δ-) – *rev3Δ*, (-▲-) – *hsm3-1rev3Δ*

Для подтверждения данного предположения мы дополнительно исследовали взаимодействие мутаций *hsm3* с мутациями по генам, контролирующим безошибочный путь пострепликативной репарации – *srs2*, *rad18* и *mms2*. В экспериментах мы наблюдали эпистатический характер взаимодействия между мутациями *hsm3* и каждой из перечисленных выше мутаций.

У штамма *mms2* наблюдался УФ индуцированный мутагенез значительно ниже, чем у *hsm3*, близкий к уровню штамма дикого типа (Рис. 5). Уровень мутагенеза для двойного мутанта *mms2hsm3* статистически совпадал с уровнем мутагенеза одиночного мутанта *mms2*.

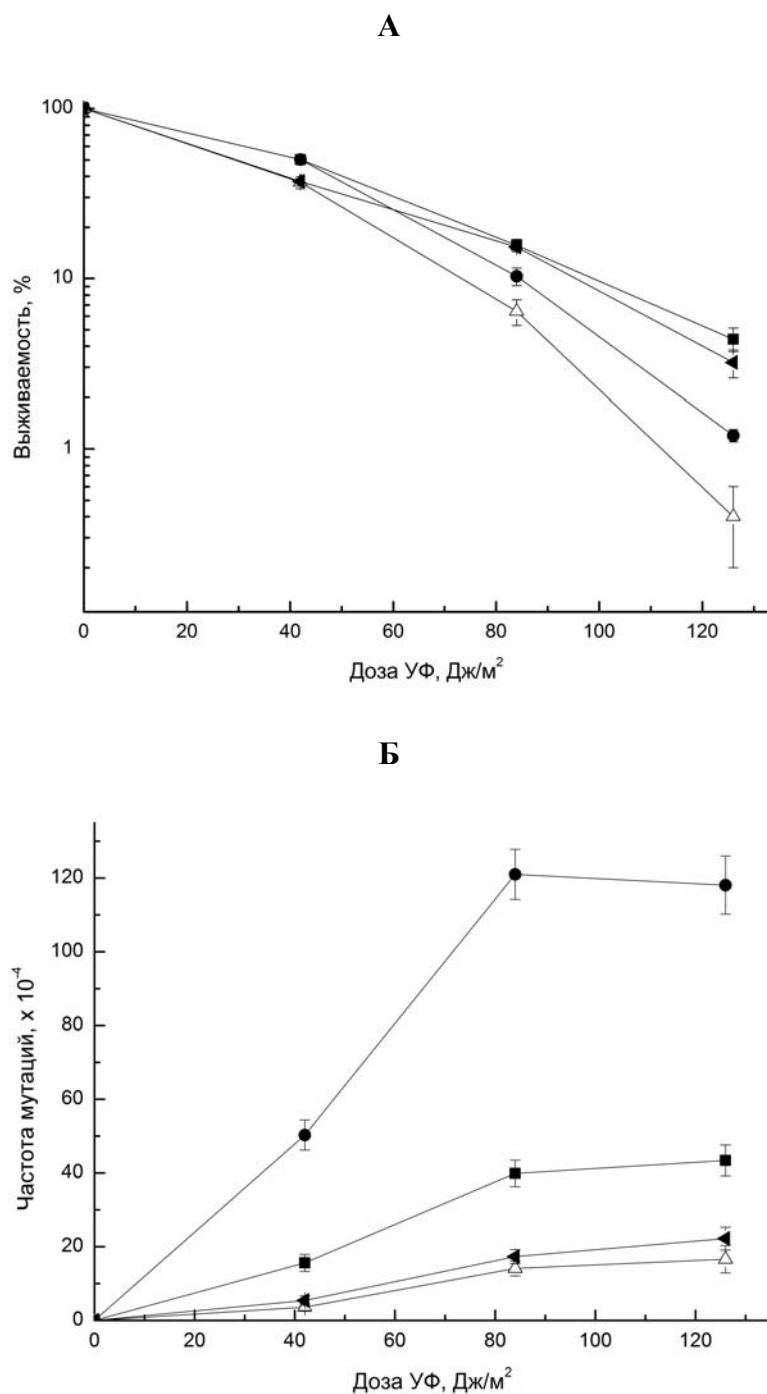


Рисунок 5. (А) Выживаемость и (Б) мутагенез по 5 *ADE*-локусам под действием УФ лучей у штаммов: (-■-) – *ДТ*, (-●-) – *hsm3-1*, (-Δ-) – *mms2Δ*, (-◄-) – *hsm3-1mms2Δ*

Уровень мутагенеза у двойного мутанта *srs2hsm3* был ниже, чем у обоих одиночных мутантов (Рис. 6). Это позволило выдвинуть предположение, что наряду с геном *HSM3* на *RAD5*-зависимой ветви ПРР может принимать участие система коррекции ошибочно спаренных оснований (мисматч-репарация).

Ген *PMS1* играет ключевую роль в мисматч-репарации у дрожжей; при введении мутации *pms1* в двойной мутант *srs2hsm3* УФ индуцированный мутагенез у тройного мутанта повысился до уровня мутагенеза одиночного мутанта *srs2*, что говорит об участии системы КОСО в процессе репарации в качестве компенсирующей системы.

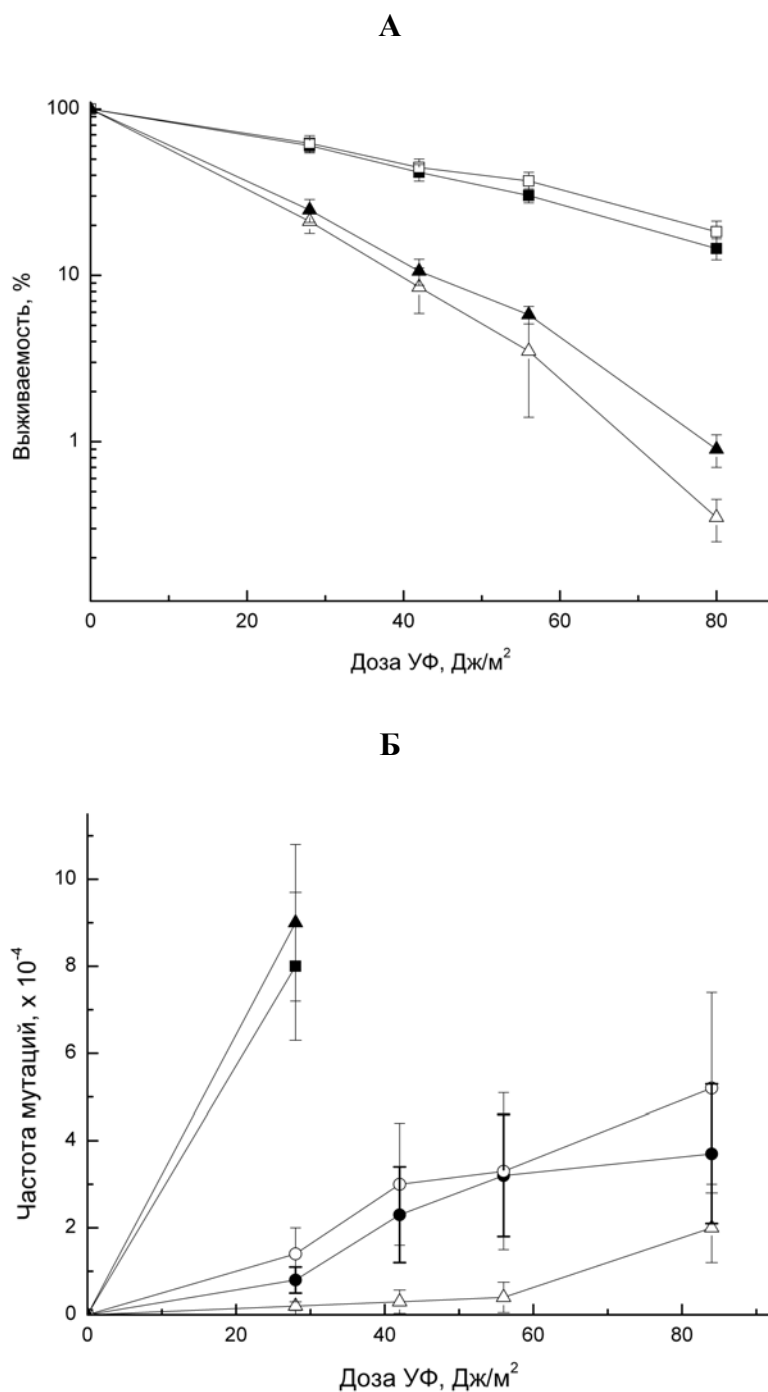


Рисунок 6. (А) Выживаемость и (Б) мутагенез по 5 *ADE*-локусам под действием УФ лучей у штаммов: (-■-) – *WT*, (-▲-) – *hsm3-1*, (-●-) – *srs2Δ*, (-Δ-) – *hsm3-1rsrs2Δ*, (-○-) – *hsm3-1rsrs2Δpms1Δ*

### 3.9. Взаимодействие гена *HSM3* с генами, контролирующими гомологичную рекомбинационную репарацию у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*

D-петли возникают в виде репарационных интермедиатов как в *RAD6*-, так и *RAD52*-контролируемых путях репарации, которые функционируют независимо друг от друга. В последнем случае это происходит в процессе репарации двунитевых разрывов (ДНР) ДНК. Ключевой стадией в гомологичной рекомбинации является обмен нитями ДНК, который обычно происходит при внедрении филамента, образованного на однострессовой ДНК белком Rad51, в дуплексную ДНК. Продукты генов *XRS2*, *RAD52*, *RAD54* и ряда других генов эпистатической группы *RAD52* способствуют эффективному протеканию этой стадии. Делеция ключевых генов этой эпистатической группы приводит к небольшому увеличению

чувствительности клеток к УФ лучам и слабому снижению эффективности пострепликативной репарации.

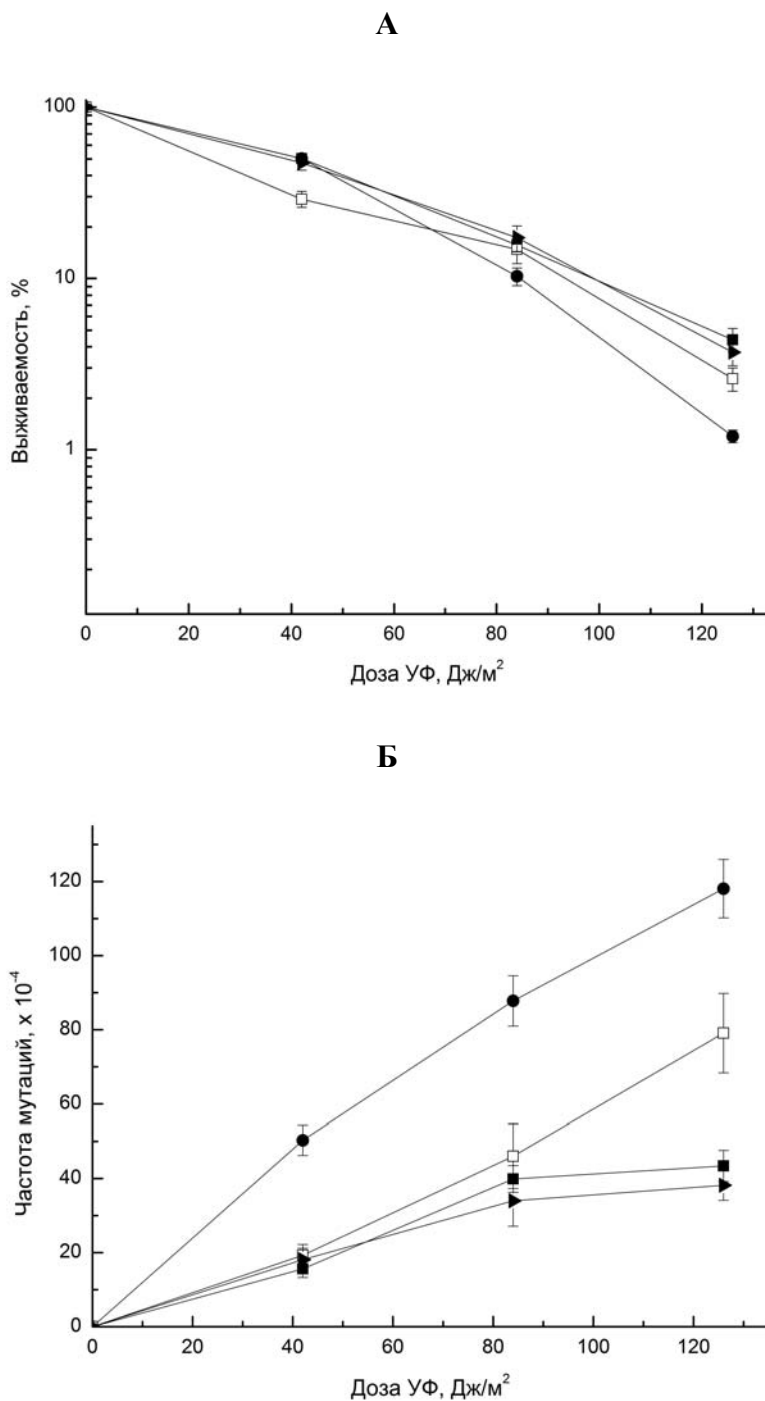


Рисунок 7. (А) Выживаемость и (Б) мутагенез по 5 *ADE*-локусам под действием УФ лучей у штаммов: (-■-) – ДТ, (-●-) – *hsm3-1*, (-□-) – *mms4Δ*, (-▶-) – *hsm3-1mms4Δ*

После УФ облучения клеток двунитевые разрывы (ДНР) ДНК могут возникать при процессинге остановленной или заблокированной на поврежденной матрице репликативной вилки. Показано, что эндонуклеазой, которая может индуцировать такие ДНР ДНК, является комплекс Mus81-Mms4. В мутанте *mms4* часть заблокированных репликативных вилок будет приводить к летальным событиям, в то же время ДНР не будут образовываться и, как следствие, не будут возникать субстраты для действия белка Hsm3. В результате уровень УФ индуцированного мутагенеза в штаммах дикого типа, одиночном *mms4* и двойном *hsm3mms4*

должны быть примерно одинаковыми, что и наблюдалось в эксперименте (Рис. 7). Одиночный мутант *hsm3* имел высокий УФ индуцированный мутагенез. Уровень мутагенеза при всех дозах у двойного мутанта *hsm3-1mms4Δ* практически идентичен таковому у штамма дикого типа, в то время как при больших дозах одиночный мутант *mms4Δ* показал уровень мутагенеза промежуточный между уровнями штамма дикого типа и одиночного мутанта *hsm3-1*.

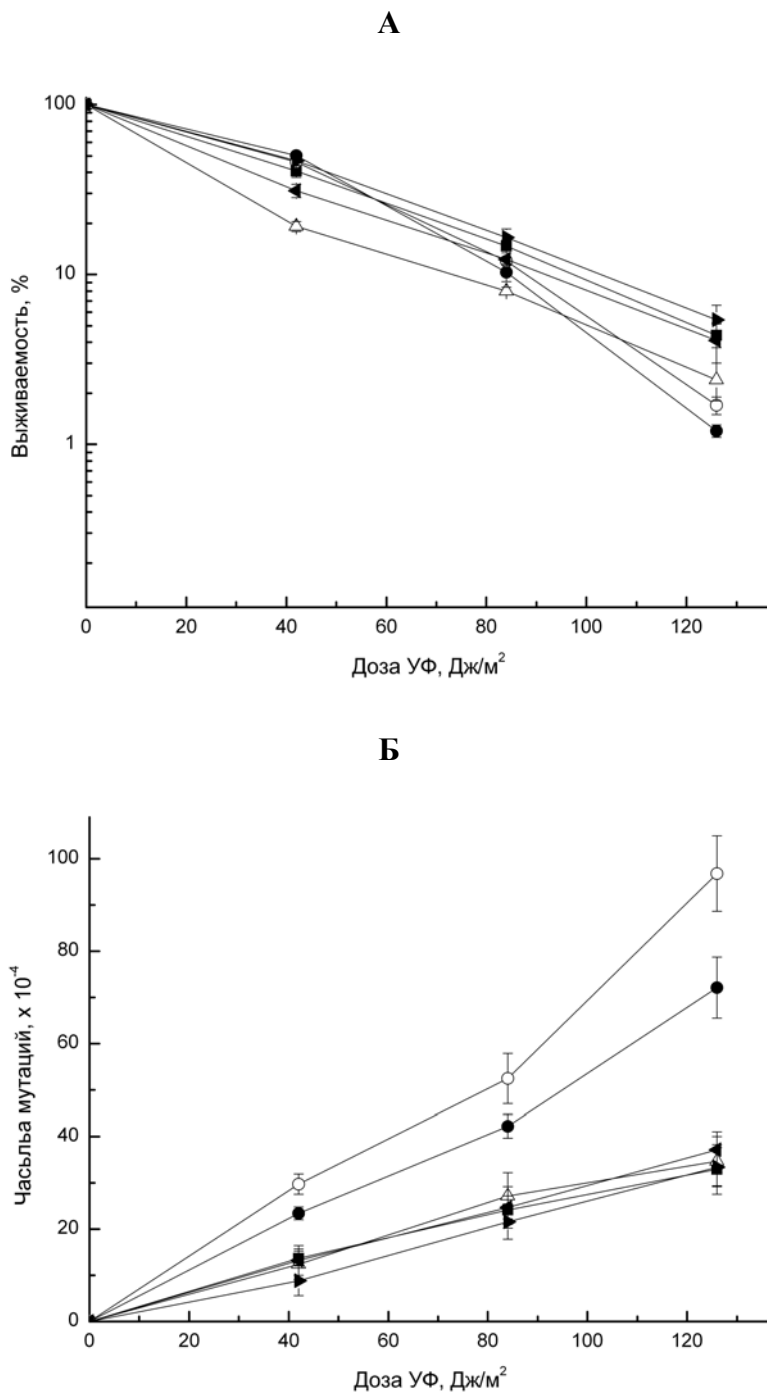


Рисунок 8. (А) Выживаемость и (Б) мутагенез по 5 *ADE*-локусам под действием УФ лучей у штаммов: (-■-) – ДТ, (-●-) – *hsm3-1*, (-○-) – *hsm3Δ*, (-Δ-) – *xrs2Δ*, (-◄-) – *hsm3-1xrs2Δ*, (-►-) – *hsm3Δxrs2Δ*

В то же время концы ДНР являются субстратами для белкового комплекса MRX, в состав которого входят продукты трех генов *MRE11(RAD58)*, *RAD50*, *XRS2*. Комплекс обеспечивает инициацию гомологичной рекомбинационной репарации. Инактивация любого из трех генов

белкового комплекса MRX блокирует инициацию репарации ДНР по механизму гомологичной рекомбинации. Следовательно, в мутанте *xrs2* образование D-петель, инициированных репарацией ДНР, не будет происходить, так как не возникнут субстраты для действия белка Hsm3.

Мутация *xrs2* не изменяла уровень мутагенеза по сравнению со штаммом дикого типа. Мутагенез у двойного мутанта *xrs2hsm3* сравним с мутагенезом штаммов *xrs2* и дикого типа. Таким образом, в этом случае мы наблюдаем эпистатическое взаимодействие генов (Рис. 8), при котором функция гена *XRS2* осуществляется на более раннем этапе по сравнению с геном *HSM3*. Как видно из Рис. 8, мутация *xrs2* полностью блокирует *HSM3*-зависимый мутагенез. На основании представленных данных можно сделать вывод, что *HSM3*-зависимый мутагенез является следствием репарации ДНР ДНК, возникших в процессе разрешения заблокированной вилки репликации.

В Табл. 2 приведены частоты возникновения спонтанных мутаций канаванин-устойчивости, измеренные методом упорядоченного посева и с помощью флуктуационного теста, для исследованных мутантов. Из данных Табл. 2 видно, что уровень репликативного мутагенеза у двойных мутантов снижен, в то время как уровень репаративного мутагенеза у них повышенный по сравнению с одиночным мутантом *xrs2Δ*.

Таблица 2. Учет влияния мутаций *hsm3-1* и *hsm3Δ* на спонтанный мутагенез канаванин-устойчивости ( $CAN^S \rightarrow CAN^R$ ) при взаимодействии с мутацией *xrs2Δ*

Штамм	Упорядоченный посев, $\times 10^{-7}$	Флуктуационный тест, $\times 10^{-7}$
ДТ	$3,6 \pm 0,6$	$3,4 \pm 0,8$
<i>hsm3-1</i>	$15,8 \pm 0,4$	$5,0 \pm 0,3$
<i>hsm3Δ</i>	$7,4 \pm 1,0$	$3,2 \pm 0,3$
<i>xrs2Δ</i>	$56,3 \pm 5,7$	$34,1 \pm 4,1$
<i>hsm3-1xrs2Δ</i>	$89,9 \pm 7,5$	$25,6 \pm 3,1$
<i>hsm3Δxrs2Δ</i>	$79,8 \pm 5,6$	$21,2 \pm 4,0$

В результате процесса деградации 5'-концов ДНР, инициированного комплексом MRX, образуются 3'-однонитевые «хвосты» ДНК, которые могут использоваться белком Rad5 в безошибочной ветви пострепликативной репарации и белком Rad51 в рекомбинационной репарации. Оба эти белка формируют D-петли в сестринской хроматиде. Основную роль в безошибочной ветви PPP играет субпуть, контролируемый Rad5p, в то время как Rad51p обеспечивает лишь небольшую часть репарационных событий. Полученные нами данные показывают, что разрушение в мутанте *hsm3* генов *RAD51*, *RAD52* и *RAD54* слабо снижает уровень *HSM3*-зависимого мутагенеза (Рис. 9). По-видимому, остальная часть этого мутагенеза в штамме *hsm3rad51* обеспечивается Rad5p-зависимым субпутем PPP.

Продукты генов *RAD51*, *RAD52* и *RAD54* работают на более поздних, чем продукт гена *XRS2*, этапах рекомбинационной репарации. Белки Rad51, Rad52 и Rad54 являются ключевыми в гомологичной рекомбинационной репарации. Мутации *rad51*, *rad52* и *rad54* показали одинаковый тип взаимодействия с мутацией *hsm3*; для иллюстрации использованы результаты по изучению взаимодействия мутаций *hsm3* и *rad51*. На Рис. 9 представлен УФ-индуцированный мутагенез для штамма дикого типа, мутантов *rad51* и *hsm3*, а также двойного мутанта *rad51hsm3*. Мутагенез у мутанта *rad51* был несколько выше, чем у штамма дикого типа, но ниже, чем у мутанта *hsm3*, а мутагенез у двойного мутанта *rad51hsm3* имел промежуточный уровень: ниже, чем у *hsm3*, и выше, чем у *rad51*. Таким образом, в эксперименте мы наблюдали частичное подавление *HSM3*-зависимого мутагенеза, в отличие от полного подавления при комбинации мутаций *hsm3* и *xrs2*. Такой же тип взаимодействия наблюдали в случае УФ индуцированного мутагенеза в сериях опытов с двойными мутантами *hsm3rad52* и *hsm3rad54*.

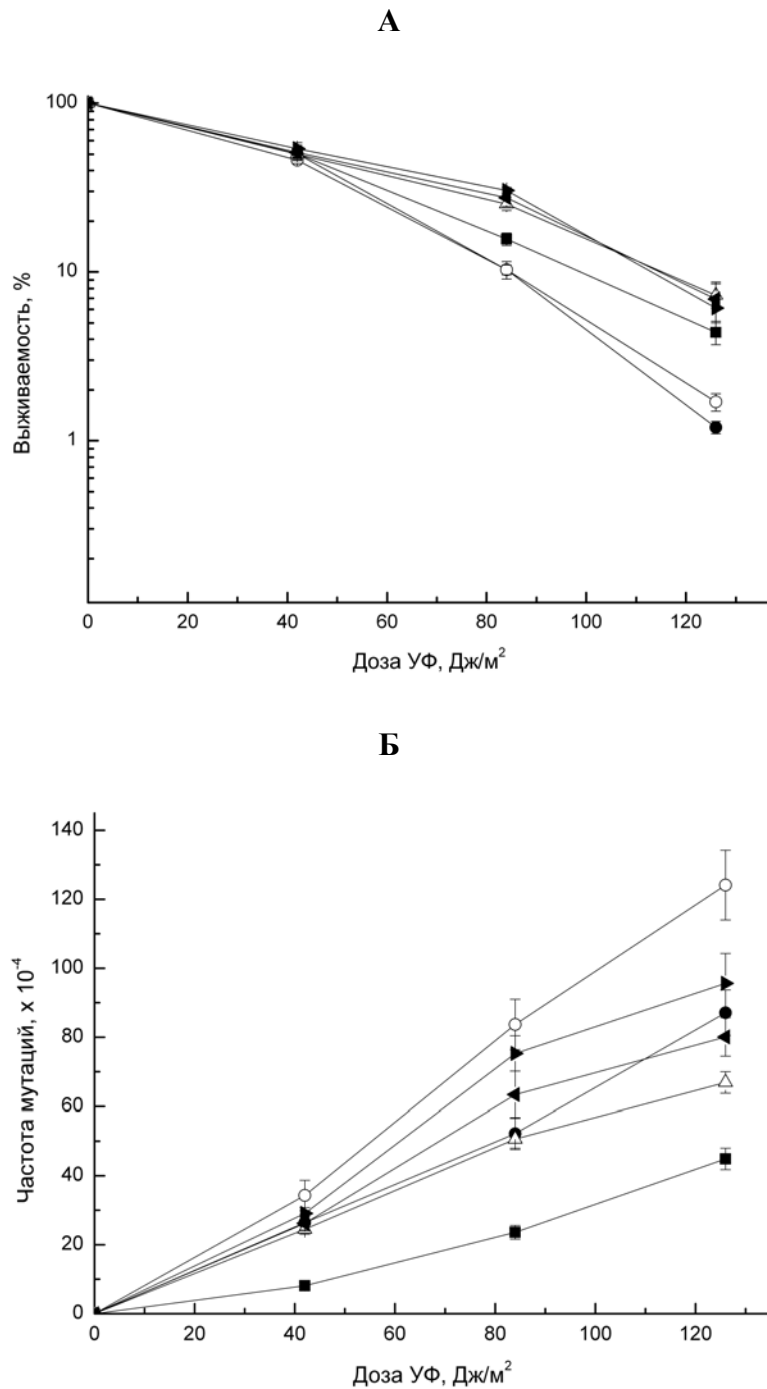


Рисунок 9. (А) Выживаемость и (Б) мутагенез по 5 *ADE*-локусам под действием УФ лучей у штаммов: (-■-) – ДТ, (-●-) – *hsm3-1*, (-○-) – *hsm3Δ*, (-Δ-) – *rad51Δ*, (-◄-) – *hsm3-1rad51Δ*, (-►-) – *hsm3Δrad51Δ*

В Табл. 3 приведены данные по учету возникновения спонтанных мутаций канаванин-устойчивости методом упорядоченного посева и флуктуационным тестом для исследованных мутаций.

Мы наблюдали эпистатический характер взаимодействия мутаций *hsm3* и *rad51Δ*, что позволило говорить о совместной работе генов *RAD51* и *HSM3* на пути гомологичной рекомбинационной репарации.

Таблица 3. Учет влияния мутаций *hsm3-1* и *hsm3Δ* на спонтанный мутагенез канаванин-устойчивости ( $CAN^S \rightarrow CAN^R$ ) при взаимодействии с мутацией *rad51Δ*

Штамм	Флуктуационный тест, $\times 10^{-7}$	Упорядоченный посев, $\times 10^{-7}$
<i>ДТ</i>	$3,4 \pm 0,8$	$3,6 \pm 0,6$
<i>hsm3-1</i>	$5,0 \pm 0,3$	$15,8 \pm 0,4$
<i>hsm3Δ</i>	$3,2 \pm 0,3$	$7,4 \pm 1,0$
<i>rad51Δ</i>	$32,1 \pm 5,1$	$60,3 \pm 4,9$
<i>hsm3-1rad51Δ</i>	$30,3 \pm 4,0$	$53,2 \pm 2,7$
<i>hsm3Δrad51Δ</i>	$36,4 \pm 4,2$	$77,1 \pm 8,0$

### 3.10. Взаимодействие гена *HSM3* с генами, контролирующими стабильность D-петли

Продукт гена *MPH1* обладает геликазной активностью и функционирует в процессе как образования, так и разрушения D-петель. Мутация *mph1* инактивирует основную геликазу, разрушающую структуру D-петли, чем способствует стабилизации последней. В отличие от *Mph1p*, белковый комплекс *Shu1* стабилизирует вновь образованные D-петли.

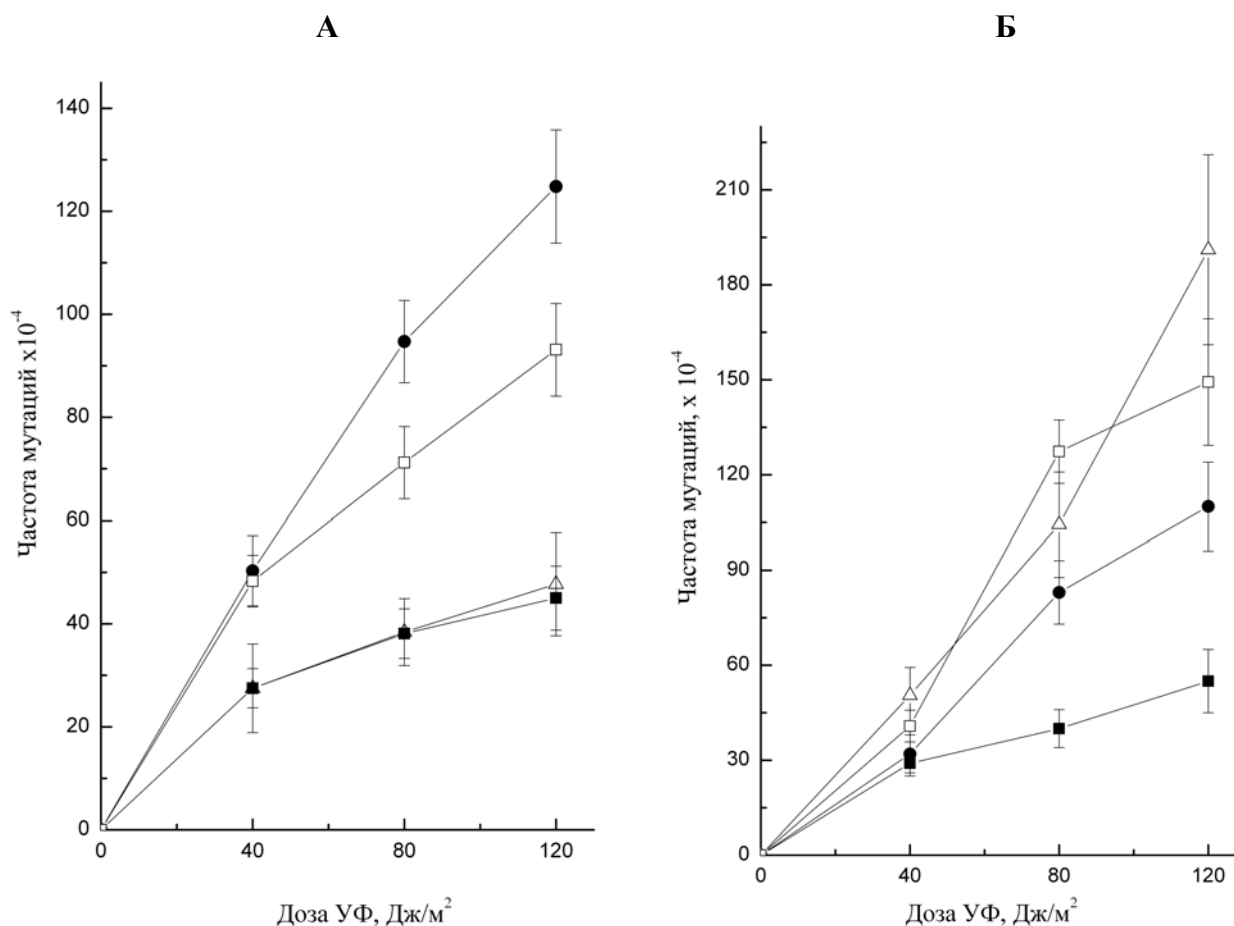


Рисунок 10. (А) Мутагенез по 5 *ADE*-локусам под действием УФ лучей для штаммов: (-■-) – *ДТ*, (-●-) – *hsm3*, (-Δ-) – *mph1*, (-□-) – *hsm3mph1*; (Б) Мутагенез по 5 *ADE*-локусам под действием УФ лучей для штаммов: (-■-) – *ДТ*, (-●-) – *hsm3*, (-Δ-) – *shu1*, (-□-) – *hsm3shu1*

Двойной мутант *hsm3mph1* показал уровень мутагенеза, промежуточный между уровнями УФ индуцированного мутагенеза у одиночных мутантов *hsm3* и *mph1* (Рис. 10А), т.е. мы наблюдали частичное подавление *HSM3*-зависимого мутагенеза. В случае комбинации мутаций *hsm3* и *shu1* взаимодействие носило эпистатический характер, и мы наблюдали полное



подавление *HSM3*-зависимого мутагенеза в двойном мутанте *hsm3shu1* (Рис. 10Б): уровень мутагенеза для него совпадал с уровнем мутагенеза у одиночного мутанта *shu1*. Таким образом, можно заключить, что мутации *hsm3* влияют на стабильность D-петли.

Суммируя полученные данные, можно сделать вывод, что мутация *hsm3* дестабилизирует ключевой субстрат обоих путей репарации (пострепликативной и гомологичной рекомбинационной) – D-петли, что приводит к резкому повышению роли ошибочной ветви ПРР (Rev3-путь) и, как следствие, значительному повышению уровня УФ индуцированного мутагенеза в клетках мутанта *hsm3*.

### 3.11. Взаимодействие гена *HSM3* с генами, контролирующими состояние хроматина

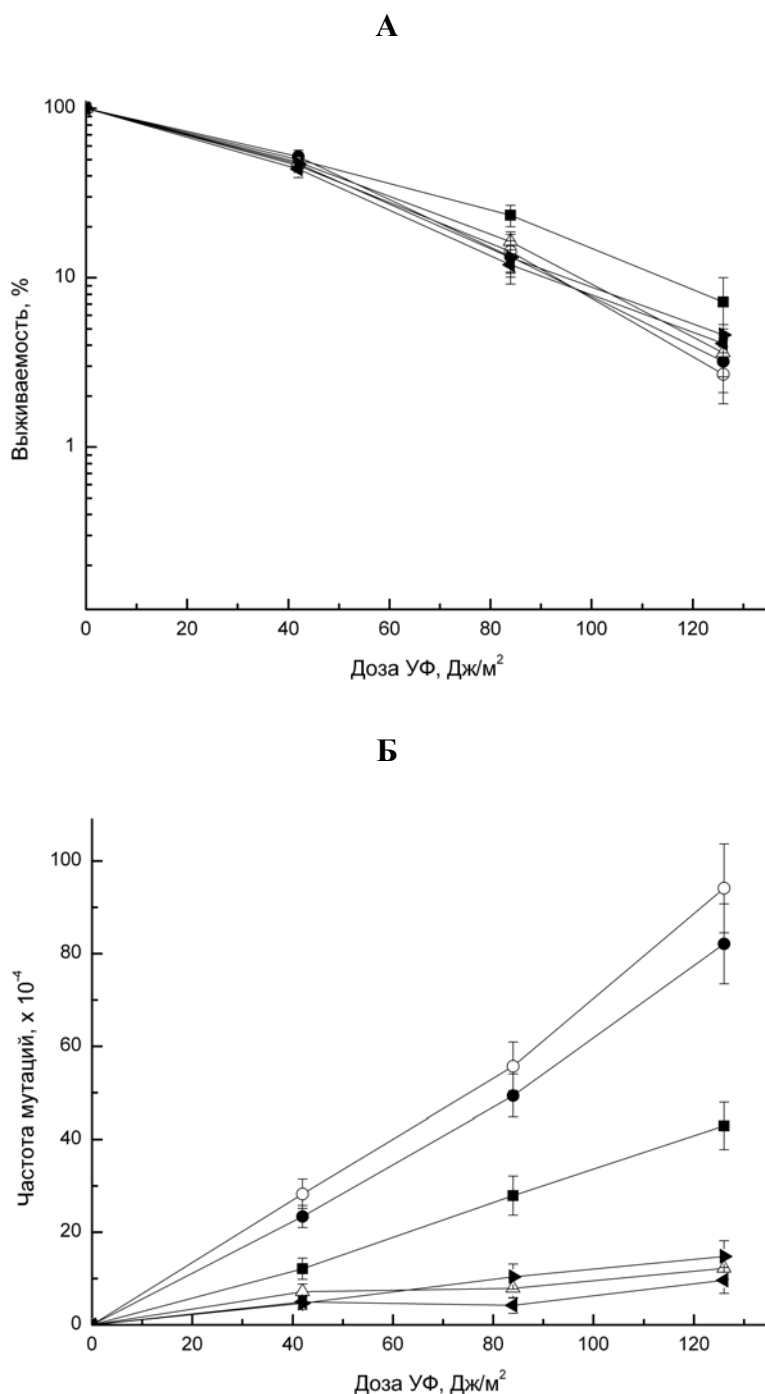


Рисунок 11. (А) Выживаемость и (Б) мутагенез по 5 *ADE*-локусам под действием УФ лучей у штаммов: (-■-) – ДТ, (-●-) – *hsm3-1*, (-○-) – *hsm3Δ*, (-Δ-) – *hat1Δ*, (-◄-) – *hsm3-1hat1Δ*, (-►-) – *hsm3Δhat1Δ*

В начале 2012 года [Takaji *et al.*, 2012] была установлена пространственная структура белка Hsm3, и показано его взаимодействие с субъединицей Rpt1 протеасомного комплекса, за которое ответственны N-концевая и центральная части Hsm3p. Точковые мутации (как и полная делеция гена), затрагивающие аминокислоты серединной части белка, влияют на его шаперонную функцию, что выражается в появлении ts-фенотипа. Проведенный нами анализ различных мутантных аллелей гена *HSM3* (п.3.2.) выявил, что мутации в С-концевом домене белка Hsm3 не проявляют ts-фенотипа, что говорит об отсутствии влияния на сборку протеасомного комплекса. Таким образом, С-концевой домен белка Hsm3 ответственен только за контроль индуцированного и спонтанного мутагенеза. Следовательно, можно сделать вывод о многофункциональности Hsm3p, обоснованной его мультидоменной структурой.

Нами было выдвинуто предположение, что функцией Hsm3p является его участие в качестве субъединицы в работе гистон ацетилтрансферазного комплекса НАТ-В/Nub4. Предположение основывалось на том, что для всех субъединиц комплекса НАТ-В/Nub4 (Hat1, Hat2 и Hif1) показано соосаждение с Hsm3p. Белок Hsm3 присоединяется к комплексу НАТ-В в цитоплазме, т.к. в структуре белка отсутствует транспортный домен и не показано наличие специфического переносчика для Hsm3p. Затем Hsm3p транспортируется в ядро в составе комплекса НАТ-В. Основная функция комплекса НАТ-В – ацетилирование по 5 и 12 положениям лизина ядерного и новосинтезированного цитоплазматического гистона H4, причем для ацетилирования необходимо присутствие положительно заряженных аминокислот в положениях 8 и 16 гистона H3. Ацетилирование гистонов необходимо, в частности, после их синтеза в цитоплазме для последующего переноса в ядро, где они встраиваются в структуру хроматина при репликации.

Нами было предпринято исследование влияния комбинации мутаций *hsm3* и *hat1Δ* на спонтанный и индуцированный мутагенез с целью генетического подтверждения их совместной работы. Частоты УФ индуцированного мутагенеза у штаммов *hsm3-1* и *hsm3Δ* статистически близки и статистически значимо выше, чем у штамма дикого типа. Одиночный мутант *hat1Δ* показал частоты мутагенеза в 2–3 раза ниже, чем у штамма дикого типа. Двойные мутанты *hsm3-1hat1Δ* и *hsm3Δhat1Δ* показали частоты мутагенеза, статистически не отличимые от одиночного мутанта *hat1Δ*. Нами показано, что в случае УФ индуцированного мутагенеза наблюдается практически полное подавление *HSM3*-зависимого мутагенеза (Рис. 11), что говорит о ключевой роли Hat1p и вспомогательной – Hsm3p – в работе гистон ацетилтрансферазного комплекса.

В случае спонтанного мутагенеза (Табл. 4) мы наблюдали отсутствие влияния на быстрый репликативный мутагенез, однако *hat1Δ* проявил тенденцию к подавлению медленного репаративного мутагенеза в комбинации с мутацией *hsm3*, что хорошо согласуется с подавлением *HSM3*-зависимого репаративного мутагенеза при УФ облучении.

Таблица 4. Частоты возникновения спонтанных мутаций канаванин-устойчивости ( $CAN^S \rightarrow CAN^R$ ) при взаимодействии мутаций *hsm3-1* и *hsm3Δ* с мутацией *hat1Δ*

ШТАММ	Упорядоченный посев, $\times 10^{-7}$	Флуктуационный тест, $\times 10^{-7}$
ДТ	$3,6 \pm 0,8$	$3,4 \pm 0,5$
<i>hsm3-1</i>	$49,0 \pm 5,1$	$5,0 \pm 0,3$
<i>hsm3Δ</i>	$54,7 \pm 6,3$	$3,9 \pm 0,4$
<i>hat1Δ</i>	$27,1 \pm 4,1$	$4,1 \pm 0,7$
<i>hsm3Δhat1Δ</i>	$23,3 \pm 5,7$	$4,1 \pm 0,3$
<i>hsm3-1hat1Δ</i>	$24,8 \pm 4,3$	$3,9 \pm 0,5$

Сходное поведение мутанта *hat1Δ* также отмечалось нами при исследовании взаимодействия мутаций *hat1Δ* и *rad1Δ*: мы наблюдали подавление *RAD1*-зависимого мутагенеза (Рис. 12) в комбинации с мутацией *hat1Δ*. Ключевым моментом является образование пика мутагенеза в начальный момент времени и постепенное снижение уровня

мутагенеза в двойном мутанте *rad1Δhat1Δ* до уровня одиночного мутанта *hat1Δ*, что может быть объяснено пониженной концентрацией дезоксирибонуклеотидов на фоне дополнительных стрессовых условий в виде отключения системы репарации NER.

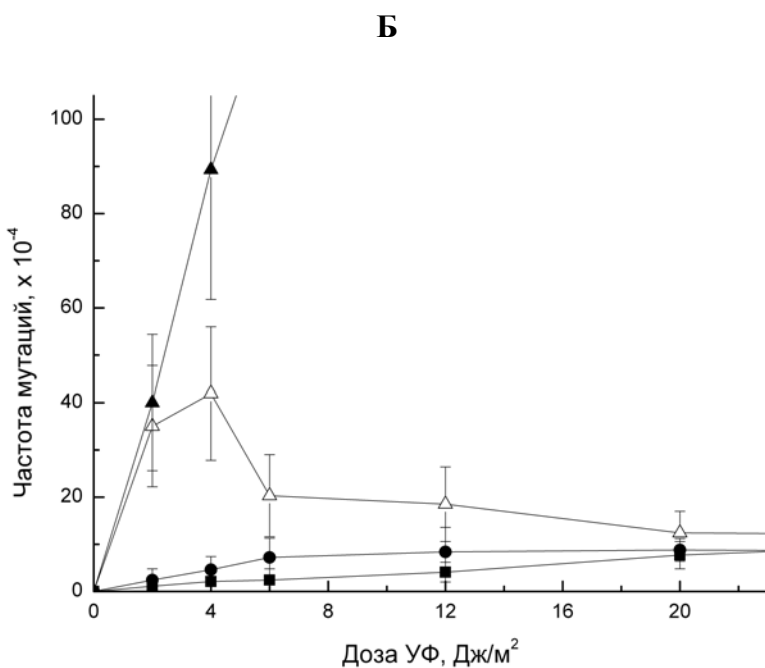
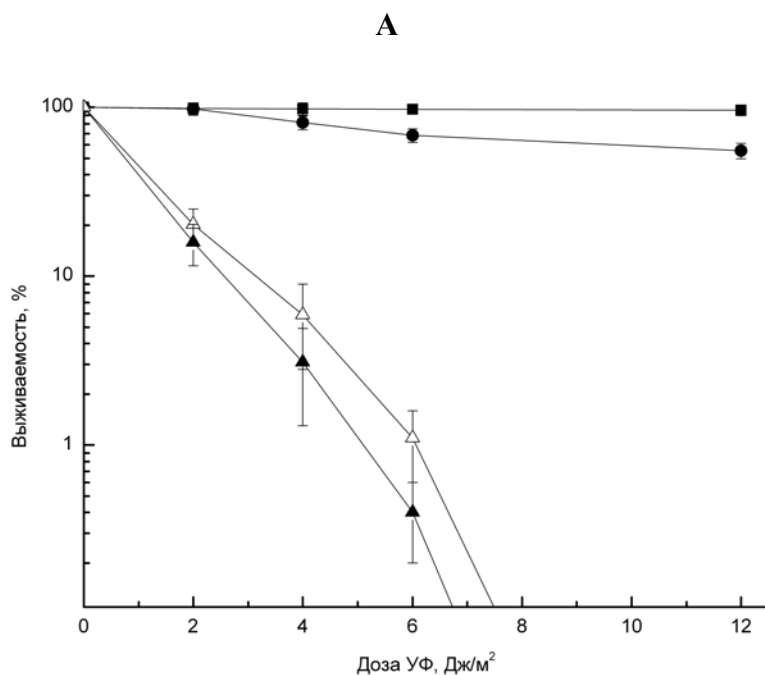


Рисунок 12. (А) Выживаемость и (Б) мутагенез по 5 *ADE*-локусам под действием УФ лучей у штаммов: (-■-) – ДТ, (-●-) – *hat1Δ*, (-▲-) – *rad1Δ*, (-Δ-) – *hat1Δrad1Δ*

Мутант *rad1* сильно чувствителен к действию УФ-облучения, а полная делеция *rad1Δ* приводит к выключению эндонуклеазной активности комплекса NEF1, что, в свою очередь, делает невозможным удаление из структуры ДНК поврежденного участка в механизме NER. На Рис. 12 отчетливо виден «пик» мутагенеза у двойного мутанта *hat1Δrad1Δ*, который можно объяснить изменением уровня дезоксирибонуклеотидов в клетке: при малых дозах облучения повышение уровня мутагенеза связано с изначально высоким уровнем дезоксирибонуклеотидов

при прохождении процесса быстрой пострепликативной репарации. Снижение уровня мутагенеза с увеличением дозы обусловлено как падением уровня дезоксирибонуклеотидов в связи с их расходом на начальном этапе репарации, так и повышением точности и увеличением времени, необходимого для репарации.

### 3.12. Качественный тест чувствительности к гидроксимочевине

Из данных литературы [Tsaronina *et al.*, 2011] известно, что на стабильность и скорость процессирования D-петли влияет концентрация (пул) свободных дезоксирибонуклеотидов, которую контролирует рибонуклеотидредуктаза (RNR). В случае недостатка дезоксирибонуклеотидов скорость процессинга D-петли снижена, и равновесие смещено в сторону ее дестабилизации. Известно также, что гены, контролирующие структуру хроматина, также контролируют и активность/транскрипцию RNR. Можно предполагать, что ген *HSM3* оказывает влияние на пул дезоксирибонуклеотидов опосредовано: нами проведен качественный тест на чувствительность исследуемых мутантов (дикого типа и различных аллелей *HSM3*) к гидроксимочевине (ГМ) – препарату, ингибирующему работу RNR, и, как следствие, снижающему пул дезоксирибонуклеотидов. В случае обработки штаммов ГМ, а также при создании дополнительного стресса (облучение УФ после обработки ГМ) мы качественно наблюдали за скоростью их роста, что позволило нам выдвинуть предположение о влиянии мутаций *hsm3* на пул дезоксирибонуклеотидов.

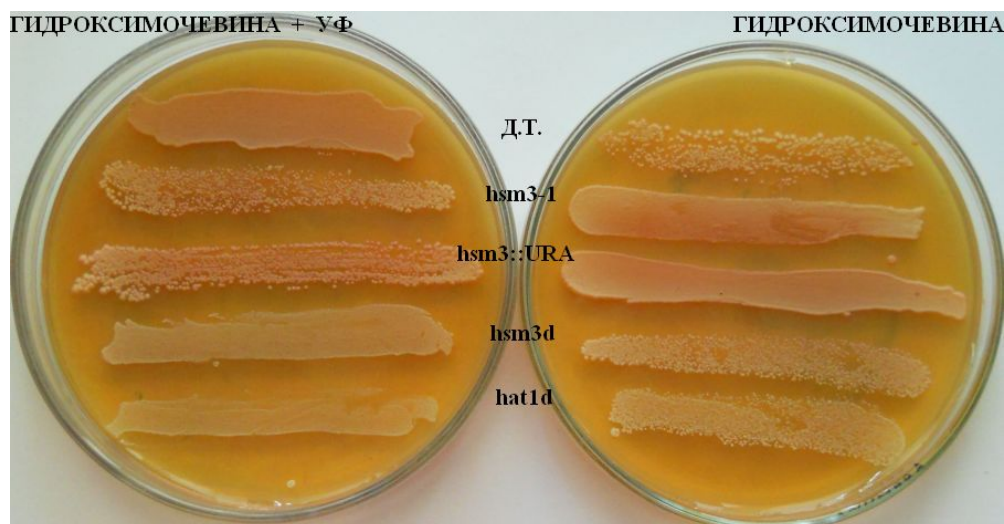


Рисунок 13. Качественный тест чувствительности штаммов ДТ, *hsm3-1*, *hsm3::URA*, *hsm3Δ* и *hat1Δ* к ГМ (правая часть рисунка) и ГМ с одновременным облучением УФ (левая часть рисунка)

В случае обработки штаммов ГМ без облучения УФ (Рис. 13, правая часть) мы наблюдали гораздо лучший рост мутантов, несущих лишь частичные повреждения (*hsm3-1* и *hsm3::URA*), чем в случае штамма дикого типа или при полной делеции гена *HSM3* (*hsm3Δ*). Можно предполагать, что точечные мутации приводят к повышению уровня дезоксирибонуклеотидов, что в свою очередь приводит к повышению уровня спонтанного репликативного мутагенеза и выживаемости, что хорошо согласуется с данными литературы [Tsaronina *et al.*, 2011]. В случае дополнительного стресса (облучения УФ) картина менялась (Рис. 13, левая часть): известно, что УФ облучение инициирует интенсивность работы RNR в 4-8 раз; таким образом, при сохраняющейся медленной скорости роста всех штаммов штаммы *hsm3-1* и *hsm3::URA* растут гораздо хуже, чем штаммы дикого типа и *hsm3Δ*. Таким образом, мы можем заключить, что Hsm3p может оказывать влияние на пул дезоксирибонуклеотидов.

Дополнительно качественный тест чувствительности к ГМ / ГМ+УФ был проведен нами для штамма, несущего мутацию *hat1Δ*: полученные данные дают косвенное подтверждение совместной работы Hsm3 и Hat1: мутации *hsm3Δ* и *hat1Δ* ведут себя сходно как в случае обработки только ГМ, так и в случае дополнительного стресса при УФ облучении (Рис. 13).

## ВЫВОДЫ

1. Ген *HSM3* участвует в контроле пострепликативной и гомологичной рекомбинационной репарации у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*.
2. Мутации в гене *HSM3* дестабилизируют ключевой интермедиат обоих указанных путей репарации – D-петли, что приводит к резкому повышению роли репарационного пути, склонного к ошибкам.
3. С-концевой домен белка Hsm3 ответственен за контроль индуцированного и спонтанного мутагенеза.
4. Белок Hsm3 участвует в работе гистон-ацетилтрансферазного комплекса НАТ-В / NuB4.

## СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Ковальцова С.В., **Черненко А.Ю.**, Королёв В.Г.. Репарация цис-платиновых аддуктов ДНК в мутантах по генам, контролирующим спонтанный и индуцированный мутагенез у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. – Генетика, 2007. – Т. 43, №1. – С. 100–104.
2. **Черненко А.Ю.**, Иванова С.В., Ковальцова С.В., Грачёва Л.М., Пешехонов В.Т., Фёдорова И.В., Королёв В.Г.. Генетический анализ доменной структуры белка Hsm3 дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. – Генетика, 2010. – Т. 46, №6. – С. 742–749.
3. **Черненко А.Ю.**, Грачёва Л.М., Евстюхина Т.А., Ковальцова С.В., Пешехонов В.Т., Фёдорова И.В., Королёв В.Г.. Взаимодействие гена *HSM3* с генами эпистатической группы *RAD6* у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. – Генетика, 2012. – Т. 48, №2. – С. 160–167.
4. **Черненко А.Ю.**, Фёдоров Д.В., Грачёва Л.М., Евстюхина Т.А., Ковальцова С.В., Пешехонов В.Т., Фёдорова И.В., Королёв В.Г.. Взаимодействие гена *HSM3* с генами, иницирующими гомологичную рекомбинационную репарацию у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. – Генетика, 2012. – Т. 48, №3. – С. 333–339.

## СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Fedorova I.V., Kovaltzova S.V., Gracheva L.M. *et al.* Requirement of *HSM3* gene for spontaneous mutagenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. – *Mutat. Res.*, 2004. – V. 554. – P. 67–75.
2. Takagi K., Kim S., Yukii H. *et al.* Structural basis for specific recognition of Rpt1p, an ATPase subunit of the 26S proteasome, by the proteasome-dedicated chaperone Hsm3p. – *J. Biol. Chem.*, 2012. – V. 287. – P. 12172–12182.
3. Tsaponina O., Barsoum E., Astrom S.U. *et al.* Ixr1 is required for the expression of the ribonucleotide reductase Rnr1 and maintenance of dNTP pools. – *PLoS Gen.*, 2011. – V. 7, Iss.5. – e1002061.