

РЕПАРАТИВНАЯ СБОРКА ХРОМАТИНА ИГРАЕТ ВАЖНУЮ РОЛЬ В СТАБИЛЬНОСТИ ГЕНОМА

© 2025 г. И. И. Скобелева¹, Т. А. Евстюхина^{1, 2}, Е. А. Алексеева^{1, 2, *}, А. В. Торощина¹,
В. Т. Пешехонов^{1, 2}, Д. В. Федоров¹, В. Г. Королев^{1, 2}

¹Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова Национального исследовательского центра
“Курчатовский институт”, Ленинградская область, Гатчина, 188300 Россия

²Курчатовский геномный центр – ПИЯФ, Ленинградская область, Гатчина, 188300 Россия

*e-mail: alekseeva_ea@pnpi.nrcki.ru

Поступила в редакцию 19.07.2024 г.

После доработки 10.09.2024 г.

Принята к публикации 16.09.2024 г.

При завершении репарации ДНК важную роль играют процессы, связанные с восстановлением нормальной структуры хроматина. Некорректная сборка хроматина может привести к геномным перестройкам, которые, в свою очередь, могут быть причиной развития многих болезней, включая рак. Ранее мы обнаружили, что нарушения правильности сборки нуклеосом и их ремоделирования в процессе репаративной сборки хроматина приводят к повышенному уровню мутагенеза. В настоящей работе мы показали, что мутация *asf1Δ* имеет конститутивно гиперактивированную киназу Rad53, что служит причиной дезорганизации структуры хроматина и значительно изменяет спектр спонтанных репаративных мутаций. Нарушение сайта связывания адаптерного белка Rad9 с ДНК в результате инактивации гена *DOT1* нивелирует *hif1Δ*-специфический мутагенез, который является следствием некорректной репаративной сборки нуклеосом. Отсутствие белка Rad9 при нормальных условиях роста и при обработке низкими дозами УФ-лучей приводит к аберрантной активации комплекса RNR. При этом дальнейшее увеличение дозы УФ-облучения практически не влияет на экспрессию *RNR3*. Эти результаты подтверждают, что корректная сборка хроматина критична для нормального функционирования генома.

Ключевые слова: *Saccharomyces cerevisiae*, ген *RAD9*, ген *DOT1*, УФ-индуцированный мутагенез, комплекс RNR.

DOI: 10.31857/S0016675825020032 **EDN:** UVVFZD

Репаративная сборка хроматина является важным шагом в поддержании стабильности генома. Правильную сборку хроматина обеспечивают шапероны гистонов, нарушение функции которых может привести к развитию различных форм рака и к ряду наследственных заболеваний у человека. Молекулярные механизмы, приводящие к дестабилизации генома при некорректной сборке хроматина, слабо изучены. В ряде своих работ мы обнаружили, что нарушения правильности сборки нуклеосом и их ремоделирования в процессе репаративной сборки хроматина приводят к повышенному уровню мутагенеза [1–4]. На стадии сборки нуклеосомы в нуклеоплазме инактивация шаперонов Hsm3 и Hif1, входящих в комплекс NuB4, и Him1 приводит к кратному повышению УФ-индуцированного мутагенеза и значительному ограничению УФ-индуцированной экспрессии генов рибонуклеотидредуктазного комплекса RNR, которая

зависит от активности киназы Rad53 [1–3]. Потеря шаперона Asf1 приводит к многократному повышению скорости спонтанного репаративного мутагенеза [4]. УФ-специфический мутагенез появляется при инактивации субъединицы Rpd3 одноименного деацетилазного комплекса RPD3, который деацетилирует гистон H4 во вновь собранных нуклеосомах [2]. Наконец, инактивация субъединицы Nhp10 ремоделирующего комплекса INO80 также увеличивает уровень УФ-индуцированного мутагенеза [5]. Во всех перечисленных случаях повышенный мутагенез связан с изменением активности чекпойнтной киназы Rad53. Возникает вопрос: каким образом сигнал о некорректно собранном хроматине передается системе, активирующей киназу Rad53? Мы предположили, что такой системой является комплекс, собирающийся в момент репарации на хроматине и состоящий из субъединиц Rad9.

RAD9 был первым чекпойнтным геном, обнаруженным у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Было показано, что он контролирует индуцированную радиацией остановку клеточного цикла в фазе G2/M [6]. Rad9 необходим для эффективной реакции на повреждение ДНК на протяжении всего клеточного цикла. Сборка Rad9 на хроматине после повреждения ДНК стимулируется модификациями гистонов, которые создают местастыковки для привлечения Rad9, запуская активацию чекпойнта. Фосфорилирование Rad53 зависит от олигомеризации Rad9; однако взаимосвязь между этими молекулярными детерминантами и их функциональное значение плохо изучены. Мутация в гене *RAD9* по Ser11 (сайт фосфорилирования Rad9 для CDK) действует синергично с мутацией, затрагивающей метилирование гистонов, приводящее к уменьшению ассоциации Rad9 с хроматином [7]. Существует параллельный путь, независимый от модификаций гистонов и регулируемый активностью CDK1, что позволяет осуществить активацию чекпойнта в отсутствие связывания Rad9 с хроматином. CDK1-зависимое фосфорилирование Rad9 по Ser11 приводит к специальному взаимодействию с Dpb11, позволяя активировать Rad53 в обход потребности в модификации гистонов [8].

Подобно Rad53 [9] привлечение Rad9 к хроматину требует связывания парных Tudor-доменов с гистоном H3, диметилированным по K79, с помощью гистонметилтрансферазы Dot1 [10].

Важно отметить, что клетки, лишенные Dot1 или несущие мутантный аллель Rad9, дефектный по связыванию с diMe-K79, по-прежнему нормально фосфорилируют гистон H2A, но являются дефектными по чекпойнту в фазе G1 и не способны фосфорилировать Rad9 или активировать Rad53.

Существует мало доказательств, подтверждающих прямой путь, связывающий фосфорилирование гистона H2A по S129 со сборкой регуляторов чекпойнта посредством ремоделирования хроматина [11]. В настоящей работе мы показали, что нарушение структуры нуклеосом и дезорганизация структуры хроматина приводят к дестабилизации генома, выражаящейся в повышении уровня мутагенеза в процессе репарационной сборки хроматина.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Штаммы

Делекции генов получали путем ПЦР-опосредованного разрушения генов [4] с использованием специфических маркеров. Штаммы, используемые в работе, происходят из коллекции группы генетических исследований хроматина и репарации Лаборатории экспериментальной генетики или были получены в ходе исследования. Генотипы штаммов

дрожжей, использованных в настоящем исследовании, представлены в табл. 1.

Получение штаммов

Для разрушения открытой рамки считывания гена *RAD9* клетки дрожжей штамма дикого типа (11D-3031) трансформировали фрагментом ДНК, содержащим маркер *KanMX*, с flankирующими нуклеотидными последовательностями, гомологичными flankам гена *RAD9*. Фрагмент генерировали путем ПЦР-амплификации с праймерами, приведенными в табл. 2, и ДНК, выделенной из штамма KFY-827 в качестве матрицы. Трансформанты с делецией гена *RAD9* отбирали по их устойчивости к канамицину (G418) с использованием полной среды, содержащей G418 в концентрации 200 мкг/мл. Разрушение гена *RAD9* было подтверждено с помощью ПЦР.

Питательные среды

Составы минимальной среды, использованной в качестве селективной, а также среды D для выращивания культур и учета выживаемости приведены в [12]. В качестве селективной среды для учета частоты УФ-индексированных мутаций устойчивости к канаванину использовали минимальную среду, обогащенную полным набором аминокислот (за исключением аргинина) и азотистых оснований. В зависимости от использованных штаммов концентрации канаванина достигали 100 мг/л.

Чувствительность к УФ-излучению

Тесты на выживаемость клеток проводили путем выращивания в течение ночи культуры соответствующего штамма в жидкойYPD при 30°C. Клетки промывали и ресуспендировали в воде с концентрацией 1×10^7 клеток/мл. Супензию клеток облучали УФ-лампой БУВ-30 (диапазон УФ-С) с мощностью дозы 1.4 Дж/м² × с. Аликвоты отбирали после различных доз облучения, разбавляли и помещали на чашки с YPD для определения количества выживших клеток.

Мутационные тесты

Мутационные тесты проводили путем выращивания в течение ночи клеток соответствующего штамма в жидкойYPD при 30°C. Клетки промывали и ресуспендировали в воде с концентрацией 1×10^7 клеток/мл. Клетки облучали УФ-лампой БУВ-30. Аликвоты отбирали после различных доз облучения, разбавляли и помещали на чашки с YPD для определения количества выживших клеток. Для определения частоты мутаций неразведененные аликвоты высевали на среду с канаванином.

Таблица 1. Штаммы дрожжей, использованные в работе

Штамм	Генотип	Источник
11D-3031	<i>MATα ade2Δ-248 ura3-160, 188 leu2-3, 112 trp1</i>	Наша коллекция
30-DVF-3031	<i>MATα ade2Δ-248 ura3-160, 188 leu2-3, 112 trp1 rad9Δ</i>	Получен в ходе исследования
TAE-210	<i>MATα ade2Δ-248 ura3-160, 188 leu2-3, 112 trp1 dot1Δ</i>	>>
TAE-201	<i>MATα ade2Δ-248 ura3-160, 188 leu2-3, 112 trp1 nhp10Δ</i>	Наша коллекция
4-DVF-3031	<i>MATα ade2Δ-248 ura3-160, 188 leu2-3, 112 trp1 asf1Δ</i>	>>
1-EAA-3031	<i>MATα ade2Δ-248 ura3-160, 188 leu2-3, 112 trp1 him1Δ</i>	>>
CAY-3	<i>MATα ade2Δ-248 ura3-160, 188 leu2-3, 112 trp1 hif1Δ</i>	>>
1-IIS-3031	<i>MATα ade2Δ-248 ura3-160, 188 leu2-3, 112 trp1 dot1Δ him1Δ</i>	Получен в ходе исследования
TAE-211	<i>MATα ade2Δ-248 ura3-160, 188 leu2-3, 112 trp1 dot1Δ hif1Δ</i>	>>
TAE-200	<i>MATα ade2Δ-248 ura3-160, 188 leu2-3, 112 trp1 ies5Δ</i>	Наша коллекция
2-IIS-3031	<i>MATα ade2Δ-248 ura3-160, 188 leu2-3, 112 trp1 dot1Δ ies5Δ</i>	Получен в ходе исследования
TAE-212	<i>MATα ade2Δ-248 ura3-160, 188 leu2-3, 112 trp1 dot1Δ nhp10Δ</i>	>>
10-DVF-3031	<i>MATα ade2Δ-248 ura3-160, 188 leu2-3, 112 trp1 rad53+HA-F</i>	Наша коллекция
TAE-213	<i>MATα ade2Δ-248 ura3-160, 188 leu2-3, 112 trp1 nhp10Δ rad53+HA-F</i>	Получен в ходе исследования

Таблица 2. Праймеры, использованные в исследовании

Обозначение	Последовательность	Источник
Праймеры, используемые для получения делеционного мутанта <i>rad9Δ</i>		
<i>RAD9_del_L</i>	5'-ATGTGAAGTGAGCAAGATAGAGAACGCC ATAGAAAAGAGCATAGTGAGAAAATCTTCAACATCAGGGCTGCTTCGTAC GCTGCAGGTCG-3'	ДНК-Синтез
<i>RAD9_del_R</i>	5'-ACCGTGTATAACTAATACCAATCTTGAACATT AACCACCTCCTGGCGTGTGGGAGGGATGTTCTTAGACTTAGCATAGGCCACT AGTGGATC-3'	>>
Праймеры, используемые для секвенирования локуса <i>can^R</i>		
-	5'-CACAACCCTCTTCACGACG-3'	Beagle
-	5'-GGAAACCCAACCTAAGAAC-3'	>>
Праймеры, используемые для проведения ПЦР в реальном времени		
<i>ForRNR3</i>	5'-ACACCTTTCATGGTTATAAG-3'	Евроген
<i>RevRNR3</i>	5'-CGACGATTCACAACATAA-3'	>>
<i>ForACT1</i>	5'-GAAGGTCAAGATCATTGC-3'	>>
<i>RevACT1</i>	5'-GTTGGAAGGTAGTCAAAG-3'	>>

Спектр мутаций *can^IR*

Суспензии клеток дрожжей высевали на селективную среду с канаванином. Независимые клонны, устойчивые к канаванину, переносили на свежую среду с канаванином. Геномную ДНК выделяли из колоний мутантов *can^IR* с использованием процедуры лизиса стеклянными шариками. Часть локуса *CAN1*, содержащая 800 пн, была амплифицирована, и анализ последовательности ДНК ПЦР-амплифицированных геномных фрагментов был выполнен с помощью секвенатора «Нанофор-5» фирмы Синтол, с использованием праймеров, приведенных в табл. 2.

ПЦР в реальном времени

Для проведения ПЦР в реальном времени была использована система детекции RT-PCR CFX96 (Bio-Rad, Великобритания). Реакции проводили в объемах 25 мкл, состоящих из 10 мкл 2.5-кратной реакционной смеси для ОТ-ПЦР в присутствии красителя SYBR Green I и эталонного красителя Rox (Syntol, Россия), 13.8 мкл воды, 1.0 мкл кДНК и 0.1 мкл (2 мМ) соответствующих праймеров (табл. 2).

Условия амплификации ПЦР были следующими: один цикл по 5 мин при 95°C, затем 39 циклов по 15 с при 95°C и 20 с при 52°C. Анализ кривой плавления показал 5-секундное увеличение на 1°C с 55 до 95°C.

Контрольные реакции с праймером и без матрицы реакционных смесей были включены. Два биологических и три технических повтора были выполнены для каждого образца. Результаты были обработаны с использованием программы CFX Manager.

Статистический анализ

Экспериментальные данные представлены как среднее и стандартная ошибка среднего (SEM) по крайней мере от трех повторов, а статистические различия определялись с помощью *t*-критерия Стьюдента. Значимость определяли на уровне *p* < 0.05 [1].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Правильную сборку хроматина обеспечивают шапероны гистонов, нарушение функции которых может привести к развитию различных форм

рака и к ряду наследственных заболеваний у человека. У дрожжей Asf1 служит шапероном гистонов H3/H4, которые он транспортирует к ДНК в составе ацетилазного комплекса NuB4 [13]. Этот комплекс состоит из каталитической субъединицы Hat1, вспомогательной Hat2, шаперонов Hif1 и Hsm3. Asf1 облегчает множество процессов, включая сборку и разборку нуклеосом, клеточный ответ на повреждение ДНК, координацию репликации, транскрипции и репарации [14–16].

ASF1

Известно, что отсутствие в клетке белка Asf1 дезорганизует структуру хроматина, что повышает скорость образования эндогенных повреждений ДНК. В результате у мутантов *asf1Δ* учащается рекомбинация сестринских хроматид [17] и увеличивается частота хромосомных перестроек [18]. Ранее мы обнаружили, что с увеличением количества повреждений ДНК (от сверхмалых до высоких) значительно снижается *asf1Δ*-специфический мутагенез [4]. Спонтанный репаративный мутагенез у одиночного мутанта *asf1Δ* в 32 раза превышал уровень штамма дикого типа [4]. Для понимания роли *asf1Δ* в спонтанном репаративном мутагенезе нами был определен спектр мутаций в локусе *CAN1* в штамме *asf1Δ*. Мы выделили 100 спонтанных мутантов *can^IR* после выращивания клеток штамма 4-DVF-3031 в течение 14 дней на среде с канаванином. Спектр мутаций у мутанта *asf1Δ* существенно отличается от такого у штамма дикого типа, полученного в работе [19]. Из 32 секвенированных мутантов, выделенных из штамма дикого типа после УФ-облучения, авторы [19] обнаружили 87% замен пар оснований и 3% одноклеточных делеций. В спектре 35 спонтанных репаративных мутаций, выделенных нами из мутанта *asf1Δ*, подавляющее число мутаций (86%) были вставки и делеции одного или более нуклеотидов и только 14% замен пар оснований (табл. 3). Таким образом, дезорганизация структуры хроматина, вызванная отсутствием в клетке шаперона Asf1, значительно изменяет спектр спонтанных репаративных мутаций, что согласуется с данными работы [19].

Ранее мы показали, что инактивация каталитической субъединицы Hat1 комплекса NuB4 приводит к сверхэкспрессии генов комплекса RNR в нормальных и УФ-облученных клетках дрожжей [1]. Так как комплекс NuB4 доставляется к ДНК с помощью шаперона Asf1, мы предположили, что и

Таблица 3. Спектр спонтанных репаративных мутаций в мутанте *asf1Δ*

Замены пар оснований				Вставки					Делеции				
GC > TA	TA > GC	GC > CG	AT > TA	A	T	C	G	TG	TTA	A	T	делеция 35 пн	
1	2	1	1	5	4	1	15	1	1	1	1	1	

мутант *asf1Δ* покажет такую же картину экспрессии генов комплекса RNR. На рис. 1 приведена сравнительная экспрессия гена *RNR3* у мутантов *asf1Δ* и *hat1Δ* до и после УФ-облучения. Из этого рисунка видно, что экспрессия *RNR3* у этих мутантов практически одинакова при обоих условиях. Известно, что экспрессия генов комплекса RNR строго зависит от активности киназы Rad53, поэтому можно утверждать, что обе мутации *asf1Δ* и *hat1Δ* имеют конститутивно гиперактивированную киназу Rad53, что и служит причиной дезорганизации структуры хроматина.

RAD9

Дрожжам *S. cerevisiae* Rad9 необходим для эффективной реакции на повреждения ДНК на протяжении всего клеточного цикла. Сборка Rad9 на хроматине после повреждения ДНК стимулируется модификациями гистонов, которые создают местастыковки для привлечения Rad9, запуская активацию чекпойнта. Рекрутирование Rad9 к хроматину требует связывания парных Tudor-доменов с гистоном H3, диметилированным по K79 с помощью гистонметилтрансферазы Dot1 [10]. Существует параллельный путь, независимый от модификаций гистонов и регулируемый активностью киназного комплекса CDK1, который запускает активацию чекпойнта в отсутствие связывания Rad9 с хроматином. Мы решили оценить относительный вклад этих путей в активацию чекпойнта при низких дозах УФ-лучей.

Мы инактивировали ген *RAD9* и изучили выживаемость и УФ-индуцированный мутагенез у мутанта *rad9Δ* при низких и высоких уровнях доз УФ-лучей. Частота УФ-индуцированного мутагенеза при низких дозах у мутанта *rad9Δ* была в 2 раза ниже по сравнению со штаммом дикого типа. При высоких дозах оба штамма показали одинаковую частоту мутагенеза (рис. 2). Мутант *rad9Δ* показал высокую УФ-чувствительность при всех использованных дозах (рис. 3).

DOT1

Ранее мы изучили роль гена *DOT1* в мутационном процессе [20]. Нами установлено, что мутация *dot1Δ* при высоких дозах УФ-лучей в значительной степени подавляет индуцированный мутагенез и показывает достоверно большую чувствительность к летальному действию излучения по сравнению со штаммом дикого типа. Однако при низких дозах по выживаемости мутант *dot1Δ* не отличался от штамма дикого типа, а его УФ-индуцированный мутагенез был незначительно понижен по сравнению со штаммом дикого типа (рис. 3). Мутант *dot1Δ* показал значительно меньшую УФ-чувствительность по сравнению с мутантом *rad9Δ* и примерно равную частоту УФ-индуцированного мутагенеза (рис. 3). Тем не менее при высоких дозах УФ-лучей частота мутагенеза у мутанта *dot1Δ* была понижена примерно в 2 раза [20], в то время как у мутанта *rad9Δ* она не отличалась от штамма дикого типа (рис. 2).

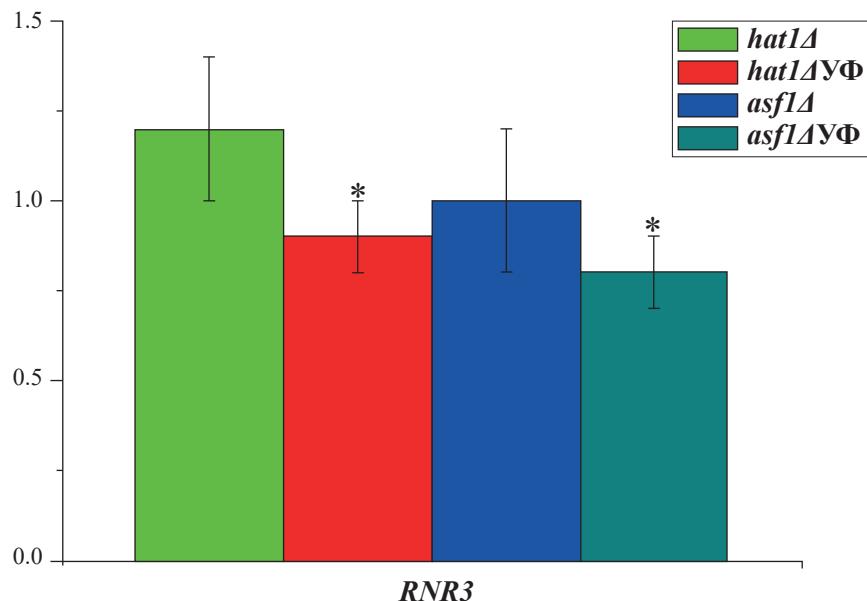


Рис. 1. Относительная нормализованная экспрессия гена *RNR3* у различных мутантных штаммов. На гистограмме приведены мутантные штаммы *hat1Δ* и *asf1Δ* до и после облучения их ультрафиолетовым светом (после УФ-облучения клетки выдерживали в течение четырех часов при 30°C в термостате для индукции), доза УФ-излучения составляла 256 Дж/м²; **p* < 0,05, *t*-критерий Стьюдента.

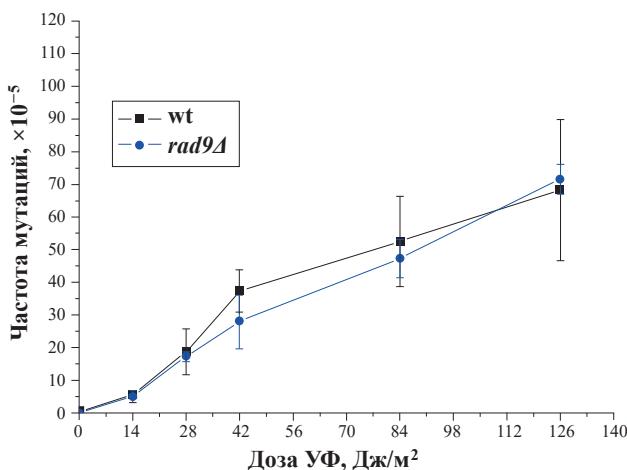


Рис. 2. Инактивация гена *RAD9* не влияет на частоту УФ-индуцированного мутагенеза в локусе *CAN1* при высоких дозах УФ. На графике представлена частота мутагенеза у штамма дикого типа и мутантного штамма *rad9Δ* при облучении дозами 14, 28, 42, 84 и 126 Дж/м² ультрафиолетового излучения. Для рис. 2–6 показаны средние значения и стандартные ошибки среднего значения (\pm SEM), полученные в результате пяти независимых экспериментов.

DOT1 и *HIM1*, *HIF1*

Мутации *him1Δ* и *hif1Δ* приводят к некорректной сборке хроматина [1, 3], следствием чего является высокий УФ-индуцированный мутагенез при высоких дозах УФ-лучей. На выживаемость при этих дозах мутация *hif1Δ* не влияла, в то время как мутация *him1Δ* приводила к слабо выраженной УФ-резистентности клеток. При низких дозах мутант *him1Δ* оказался более чувствительным, чем дикий тип (рис. 4). Мутант *hif1Δ* тоже показал слабую УФ-чувствительность (рис. 4). УФ-индуцированный мутагенез в одиночном мутанте *hif1Δ* слабо повышен по сравнению со штаммом дикого типа [5], что мы подтвердили в настоящей работе (рис. 4).

Одиночный мутант *him1Δ* в отличие от высоких доз показал слабое понижение уровня УФ-индуцированного мутагенеза по сравнению со штаммом дикого типа (рис. 4). Мутация *dot1Δ* полностью подавляла *hif1Δ*-специфический мутагенез (рис. 4), в то время как двойной мутант *dot1Δ him1Δ* не отличался по уровню УФ-индуцированного мутагенеза от обоих одиночных мутантов. Таким образом, мутация *dot1Δ* эпистатирует к *hif1Δ*. Это означает, что частичное разрушение сайта связывания Rad9 с ДНК нивелирует *hif1Δ*-специфический мутагенез. Мутант *him1Δ* ведет себя отлично от мутанта *hif1Δ*, что свидетельствует о том, что характер повреждения нуклеосом, вызванного двумя этими мутациями, различается.

DOT1 и *INO80*

Фосфорилирование гистона H2A по S129 и метилирование гистона H3 по K79 способствуют быстрому привлечению Rad9 и INO80 к хроматину и последующему его ремоделированию. Ies5 и Nhp10 являются компонентами комплекса ремоделирования хроматина INO80. Роль генов *NHP10* и *IES5* в генетическом контроле мутационного процесса при высоких дозах УФ-облучения была ранее нами изучена [5]. Мы получили нулевые мутанты по этим генам и охарактеризовали их чувствительность к высоким дозам УФ-излучения, а также их влияние на частоту УФ-индуцированных мутаций. Мутация в гене *IES5* не изменяет устойчивости клеток к УФ-излучению. В отличие от *ies5Δ* мутант *nhp10Δ* продемонстрировал слабое увеличение УФ-чувствительности. При действии высоких доз УФ мутация *ies5Δ* не влияла на частоту УФ-индуцированного мутагенеза. В отличие от *ies5Δ* мутант *nhp10Δ* усиливал УФ-индуцированный мутагенез по сравнению со штаммом дикого типа. Мы решили проверить эффекты УФ-излучения на

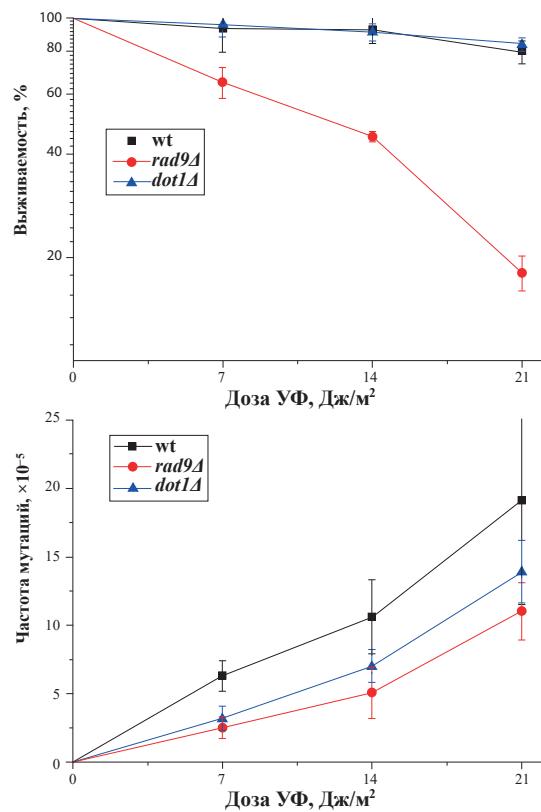


Рис. 3. Инактивация генов *RAD9* или *DOT1* приводит к снижению частоты УФ-индуцированного мутагенеза в локусе *CAN1* при низких дозах УФ и повышенной чувствительности к УФ-свету штамма *rad9Δ*. На графиках приведены штамм дикого типа и мутантные штаммы *rad9Δ* и *dot1Δ* при облучении дозами 7, 14 и 21 Дж/м² ультрафиолетового излучения.

клетки мутантов *ies5Δ* и *nhp10Δ* при низких дозах. Как видно из рис. 5, мутант *ies5Δ* не отличался от штамма дикого типа ни по выживаемости, ни по мутагенезу, что соответствует его характеристикам при высоких дозах. Мутант *nhp10Δ* снижал УФ-резистентность клеток в одинаковой степени при любых дозах.

Двойной мутант *dot1Δ ies5Δ* по этим параметрам не отличался от одиночного *dot1Δ* (рис. 5). С другой стороны, мутант *dot1Δ nhp10Δ* продемонстрировал уровень УФ-индуцированного мутагенеза и выживаемости, одинаковый с одиночным *nhp10Δ* (рис. 5). Таким образом, мутация *nhp10Δ* при низких дозах УФ-лучей эпистатирует к мутации *dot1Δ*. Возможно, это объясняется тем, что при низких дозах УФ мутация *dot1Δ* практически не влияет на мутационный процесс (рис. 3).

RNR3

Известно, что фосфорилированный Rad9 взаимодействует с COOH-концом терминального

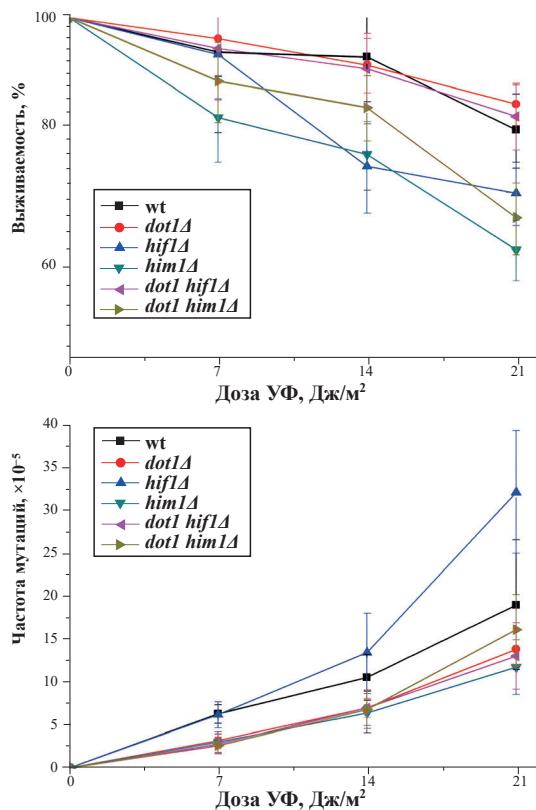


Рис. 4. Инактивация генов *HIM1* или *HIF1* в штамме *dot1Δ* оказывает влияние на чувствительность к УФ-свету и частоту УФ-индуцированного мутагенеза в локусе *CAN1* при низких дозах УФ. На графиках приведены штамм дикого типа и мутантные штаммы *dot1Δ*, *hif1Δ*, *him1Δ*, *dot1Δ him1Δ* и *dot1Δ hif1Δ* при облучении дозами 7, 14 и 21 Дж/м² ультрафиолетового излучения.

FHA-домена Rad53. Инактивация этого домена блокирует фосфорилирование Rad53, индуцированное повреждениями ДНК [10]. Ранее нами был создан мутант *rad53+HA-F* с нарушенной C-терминальной областью белка Rad53 [4], который потерял способность связываться с Rad9. При высоких дозах УФ одиночный мутант *rad53+HA-F* не отличался от штамма дикого типа ни по выживаемости, ни по УФ-индуцированному мутагенезу [4]. При низких дозах УФ-резистентность одиночного мутанта *rad53+HA-F* практически не отличалась от мутанта *nhp10Δ* (рис. 6). Тем не менее уровень УФ-индуцированного мутагенеза у штамма *rad53+HA-F* был таким же, как у штамма дикого типа. Двойной мутант *nhp10Δ rad53+HA-F* не отличался от штамма дикого типа по выживаемости (рис. 6). В то же время при этих условиях двойной мутант показал резкое понижение УФ-индуцированного мутагенеза по сравнению с обоими одиночными мутантами (рис. 6). Таким образом, мутации *nhp10Δ* и *rad53+HA-F* синергически влияют на снижение активности киназы Rad53.

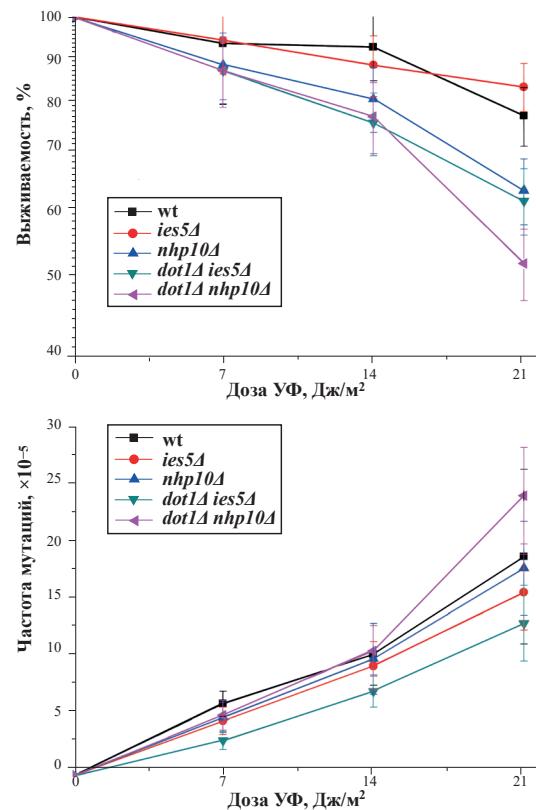


Рис. 5. Инактивация генов *IES5* или *NHP10* в штамме *dot1Δ* оказывает влияние на чувствительность к УФ-свету и частоту УФ-индуцированного мутагенеза в локусе *CAN1* при низких дозах УФ. На графиках приведены штамм дикого типа и мутантные штаммы *ies5Δ*, *nhp10Δ*, *dot1Δ ies5Δ* и *dot1Δ nhp10Δ* при облучении дозами 7, 14 и 21 Дж/м² ультрафиолетового излучения.

Киназа Rad53 регулирует активность рибонуклеотидредуктазного комплекса RNR, экспрессия генов которого зависит от активности этой киназы. Мы измерили уровни экспрессии гена *RNR3*, кодирующего одну из субъединиц комплекса RNR, до и после УФ-облучения ($14 \text{ Дж}/\text{м}^2$) у мутантов *rad9Δ*, *dot1Δ* и *dot1Δ nhp10Δ* (рис. 7).

Мутант *dot1Δ* до и после УФ-облучения достоверно не отличался по уровню экспрессии гена *RNR3* от штамма дикого типа. Ранее мы обнаружили, что одиночный мутант *nhp10Δ* слабо понижал уровень экспрессии гена *RNR3* без облучения и значимо повышал его после облучения высокими дозами УФ [5]. В двойном мутанте *dot1Δ nhp10Δ* характер зависимости экспрессии *RNR3* от облучения совпадает с таковым у одиночного мутанта *nhp10Δ*. Неожиданно уровень экспрессии гена *RNR3* у мутанта *rad9Δ* без облучения оказался в 5 раз выше по сравнению со штаммом дикого типа, а после облучения понизился до двухкратного. Высокие дозы УФ-лучей практически не изменили уровень экспрессии гена *RNR3* у мутанта *rad9Δ* (рис. 7). Этот результат показывает, что при нормальных условиях и при низких уровнях УФ-облучения отсутствие белка Rad9 приводит к aberrантной активации комплекса RNR. При этом дальнейшее увеличение дозы УФ-облучения практически не влияет на экспрессию *RNR3*.

ОБСУЖДЕНИЕ

Чекпойнтная киназа Rad53 играет ключевую роль в стабилизации генома после репарации ДНК. Для выполнения этой роли Rad53 должна быть активирована, причем степень активации этого белка может определять выполняемую им функцию. Например, для регуляции фазы G1 чекпойнта достаточно гипоактивация Rad53, в то время как для репарации двойных разрывов ДНК необходима гиперактивация этого белка. Rad53 фосфорилируется и активируется киназами Mec1 и Tel1 в ответ на повреждение ДНК. В неповрежденных клетках гипофосфорилированный Rad9 существует в виде большого комплекса (C850 кДа), содержащего белки-шапероны Ssa1 и/или Ssa2, которые способствуют стабильности комплекса [21, 22]. Предполагается, что Ssa1/Ssa2 облегчает Mec1-зависимое привлечение комплекса Rad9 [21]. Небольшая доля гипофосфорилированного Rad9 связана с хроматином в фазах G1 и G2/M, и предполагается, что эта динамическая ассоциация может повысить скорость и эффективность реакции Rad9-зависимого чекпойнта [22].

Инактивация адаптерного белка Rad9 приводит к гиперактивации комплекса RNR, что свидетельствует о гиперактивации киназы Rad53 (рис. 7). При этом УФ-индексированный мутагенез у клеток мутанта *rad9Δ* не отличается от клеток штамма

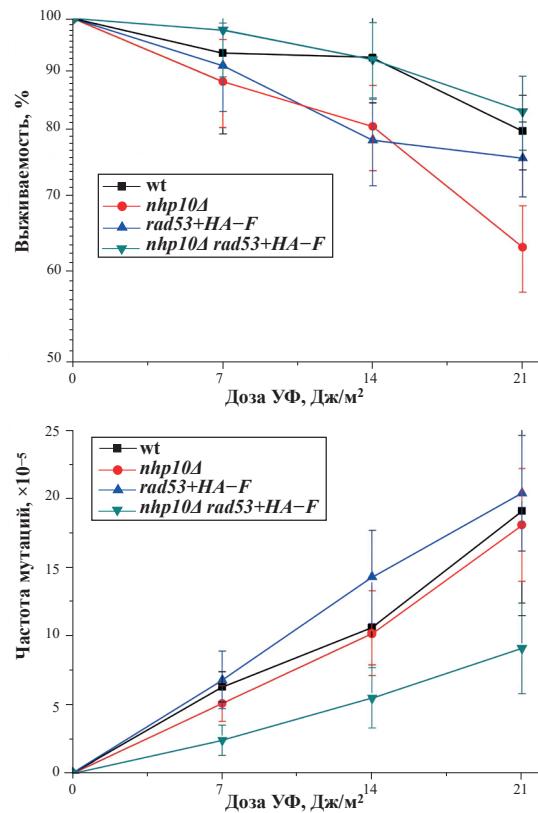


Рис. 6. Инактивация гена *NHP10* в штамме *rad53+HA-F* не влияет на чувствительность к УФ-свету и приводит к снижению частоты УФ-индексированного мутагенеза в локусе *CAN1* при низких дозах УФ. На графиках приведены штамм дикого типа и мутантные штаммы *nhp10Δ*, *rad53+HA-F* и *nhp10Δ rad53+HA-F* при облучении дозами 7, 14 и 21 $\text{Дж}/\text{м}^2$ ультрафиолетового излучения.

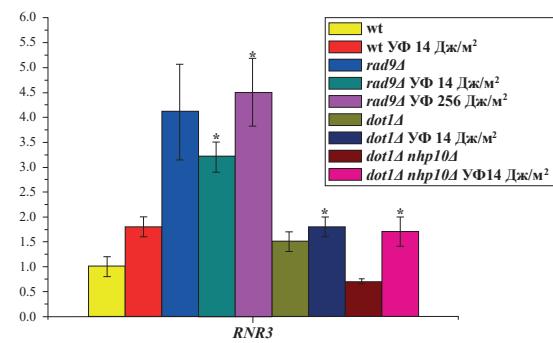


Рис. 7. Относительная нормализованная экспрессия гена *RNR3* у различных мутантных штаммов. На гистограмме приведены штамм дикого типа и мутантные штаммы *rad9Δ*, *dot1Δ* и *dot1Δ nhp10Δ* до и после облучения их ультрафиолетовым светом (после УФ-облучения клетки выдерживали в течение четырех часов при 30°C в термостате для индукции), доза УФ-излучения составляла 14 и 256 $\text{Дж}/\text{м}^2$; * $p < 0.05$, *t*-критерий Стьюдента.

дикого типа. Возможно, что в большом комплексе присутствие Rad9 негативно регулирует активацию Rad53. После исчезновения из комплекса белка Rad9 белки-шапероны Ssa1 и/или Ssa2, связанные с Rad53, стимулируют автоФосфорилирование последнего.

Мутант *dot1Δ* показывает более низкий уровень УФ-индуцированного мутагенеза по сравнению со штаммом дикого типа, что отличает его от мутанта *rad9Δ* [7]. Показано, что мутация *dot1Δ* приводит к увеличенному мутагенезу, индуцированному метилметансульфонатом (MMC), который зависит от активности ДНК-полимеразы Rev3/Rev7, что свидетельствует о том, что Dot1 негативно регулирует мутагенный путь обхода повреждений ДНК. Мутант *dot1Δ* более устойчив, чем дикий тип, к высоким дозам MMC [23, 24]. Таким образом, пониженный уровень УФ-индуцированного мутагенеза у мутанта *dot1Δ* связан с нарушением работы ошибочной ветви пострепликативной reparации и не имеет отношения к активации чекпойнта.

Сборка хроматина тесно связана с синтезом ДНК во время репликации [23]. Дефектная сборка нуклеосом в *asf1Δ* может разорвать эту связь и нарушить синтез ДНК, что приведет к накоплению повреждений ДНК. Показано, что *asf1Δ* демонстрирует высокие уровни сестринских хроматидных обменов (SCE). При этом дефектная сборка хроматина, вызванная *asf1Δ*, приводит к образованию ДНР ДНК, которые могут быть reparированы с помощью SCE, что влияет на генетическую стабильность [18]. Для лучшего понимания как модуляция хроматина регулирует реакцию на повреждение ДНК мы исследовали роль мутанта *asf1Δ* в мутационном процессе. Наше исследование показывает, что *asf1Δ* приводит к конституционной гиперактивации киназы Rad53, что и служит причиной дезорганизации структуры хроматина. Как следствие, значительно изменяется спектр спонтанных reparативных мутаций. Следовательно, корректное встраивание гистонов необходимо для предотвращения генетической нестабильности во время reparативного синтеза ДНК. Таким образом, наши результаты подтверждают важность корректной сборки хроматина в поддержании генетической стабильности.

Некорректная сборка нуклеосом в мутантах *him1Δ* и *hif1Δ* в меньшей степени влияет на активность Rad53 [1], по-видимому, в результате ухудшения связывания ремоделирующего комплекса INO80 с хроматином. Это предположение подтверждается данными, полученными с двойными мутантами *hsm3Δ ies5Δ* и *hif1Δ ies5Δ*, которые показали гиперчувствительность к УФ-облучению [5]. Двойные мутанты *hif1Δ nhp10Δ* и *hsm3Δ nhp10Δ* не отличались от одиночного *nhp10Δ*. Во всех двойных мутантах уровень УФ-индуцированного мутагенеза не отличался от штамма дикого типа [5],

т. е. нарушения в сборке нуклеосом ухудшают работу дефектного комплекса INO80. Еще одним подтверждением высказанного выше предположения являются результаты, полученные с двойными мутантами *dot1Δ him1Δ* и *dot1Δ hif1Δ* (рис. 4). Оба двойных мутанта не отличались от одиночного *dot1Δ*, что свидетельствует о том, что отсутствие связанного с хроматином белка Rad9 ликвидирует *him1Δ*- и *hif1Δ*-специфический мутагенез. Таким образом, некорректная сборка нуклеосом интерферирует с повреждениями комплекса INO80 в процессе ремодуляции хроматина.

Работа выполнена при финансовой поддержкегранта РНФ № 23-24-00119.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием в качестве объекта животных.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием в качестве объекта людей.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Evstyukhina T.A., Alekseeva E.A., Fedorov D.V. et al. Genetic analysis of the Hsm3 protein function in yeast *Saccharomyces cerevisiae* NuB4 complex // Genes. 2021. V. 12. P. 1083.
<https://doi.org/10.3390/genes12071083>
2. Alekseeva E.A., Evstyukhina T.A., Peshekhonov V.T. et al. The role of the RPD3 complex of *Saccharomyces cerevisiae* yeast in the activation of UV-induced expression of RNR complex genes // J. Biomed. Res. Environ. Sc. 2024. V. 5. P. 360–372.
<https://doi.org/10.37871/jbres1902>
3. Alekseeva E.A., Evstyukhina T.A., Peshekhonov V.T., Korolev V.G. Participation of the *HIM1* gene of yeast *Saccharomyces cerevisiae* in the error-free branch of post-replicative repair and role Pol η in *him1*-dependent mutagenesis // Curr Genet. 2021. V. 67. P. 141–151.
<https://doi.org/10.1007/s00294-020-01115-6>
4. Evstyukhina T.A., Alekseeva E.A., Peshekhonov V.T. et al. The role of chromatin assembly factors in induced mutagenesis at low levels of DNA damage // Genes. 2023. V. 14. P. 1242.
<https://doi.org/10.3390/genes14061242>
5. Евстюхина Т.А., Алексеева Е.А., Скобелева И.И. и др. Роль различных субъединиц ремоделирующего комплекса INO80 в reparационной сборке хроматина у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* // Генетика. 2024. Т. 60. № 7. Р. 000.
6. Weinert T.A., Hartwell L.H. The *RAD9* gene controls the cycle response to DNA damage checkpoint in *Saccharomyces cerevisiae* // Science. 1988. V. 241. P. 317–322.
<https://doi.org/10.1126/science.3291120>

7. Vialard J.E., Gilbert C.S., Green C.M., Lowndes N.F. The budding yeast Rad9 checkpoint protein is subjected to Mec1/Tel1-dependent hyperphosphorylation and interacts with Rad53 after DNA damage // *EMBO J.* 1998. V. 17. P. 5679–5688.
<https://doi.org/10.1093/emboj/17.19.5679>
8. Granata M., Lazzaro F., Novarina D. et al. Dynamics of Rad9 chromatin binding and checkpoint function are mediated by its demirization and are cell cycle-regulated by CDK1 activity // *PLoS Genetics.* 2010. V. 6. P. e1001047. doi:10.1371/journal.gen.1001047
9. Sun Z., Hsiao J., Fay D.S., Stern D.F. Rad53 FHA domain associated with phosphorylated Rad9 in the DNA damage checkpoint // *Science.* 1998. V. 281. P. 272–274.
<https://doi.org/10.1126/science.281.5374.272>
10. Wysocki R., Javaheri A., Allard S. et al. Role of Dot1-dependent histone 3 methylation in G₁ and S phase DNA damage checkpoint functions of Rad9 // *Mol. Cell. Biol.* 2005. V. 25. P. 8430–8443.
<https://doi.org/10.1128/MCB.25.19.8430-8443.2005>
11. Javaheri A., Wisocki R., Jobin-Robitaille O. et al. Yeast G₁ DNA damage checkpoint regulation by H2A phosphorylation is independent of chromatin remodeling // *PNAS.* 2006. V. 12. P. 13771–13776. doi:10.1073/pnas.0511192103
12. Захаров И.А., Кожин С.А., Кожина Т.А. и др. Сборник методик по генетике дрожжей-сахаромицетов, изд. 2-е. Л.: Наука, 1984. 144 с.
13. Keck K.M., Pemberton L.F. Histone chaperon link histone nuclear import and chromatin assembly // *Biochim. Biophys. Acta.* 2012. V. 1819. P. 277–289.
<https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2011.09.007>
14. Adkins M.W., Williams S.K., Linger J., Tyler J.K. Chromatin disassembly from the PHO5 promoter is essential for the recruitment of the general transcription machinery and coactivators // *Mol. Cell. Biol.* 2007. V. 27. P. 6372–6382.
<https://doi.org/10.1128/MCB.00981-07>
15. Mousson F., Ochsenbein F., Mann C. The histone chaperone Asf1 at the crossroads of chromatin and DNA checkpoint pathways // *Chromosoma.* 2007. V. 116. P. 79–93.
<https://doi.org/10.1007/s00412-006-0087-z>
16. Tyler J.K., Adams C.R., Chen S.R. et al. The RCAF complex mediates chromatin assembly during DNA replication and repair // *Nature.* 1999. V. 402. P. 555–560.
<https://doi.org/10.1038/990147>
17. Prado F., Cortes-Ledesma F., Aguilera A. The absence of the yeast chromatin assembly factor Asf1 increases genomic instability and sister chromatid exchange // *EMBO Rep.* 2004. V. 5. P. 497–502.
<https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400128>
18. Myung K., Pennaneach V., Kats E.S., Kolodner R.D. *Saccharomyces cerevisiae* chromatin-assembly factors that act during DNA replication function in the maintenance of genome stability // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2003. V. 100. P. 6640–6645.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1232239100>
19. Kozmin S.G., Pavlov Y.I., Kunkel T.A., Sage E. Roles of *Saccharomyces cerevisiae* DNA polymerases Polη and Polζ in response to irradiation by simulated sunlight // *Nucl. Acids Res.* 2003. V. 31. P. 4541–4552.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkg489>
20. Кожина Т.Н., Евстюхина Т.А., Пешехонов В.Т. и др. Гистон-метилазы Dot1 и Set2 контролируют уровень спонтанного и УФ-индукционного мутагенеза в дрожжах *Saccharomyces cerevisiae* // Генетика. 2016. Т. 52. № 3. С. 300–310.
21. Sharp J.A., Fouts E.T., Krawitz D.C., Kaufman P.D. Yeast histone deposition protein Asf1p requires Hir proteins and PCNA for heterochromatic silencing // *Curr Biol.* 2001. V. 11. P. 463–473.
[https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(01\)00140-3](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(01)00140-3)
22. Ge Z., Wang H., Parthun M.R. Nuclear Hat1p complex (NuB4) components participate in DNA repair-linked chromatin reassembly // *J. Biol. Chem.* 2011. V. 286. P. 16790–16799.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M110.216846>
23. Bostelman L.J., Keller A.M., Albrecht A.M. et al. Methylation of histone H3 lysine-79 by Dot1p plays multiple roles in the response to UV damage in *Saccharomyces cerevisiae* // *DNA Repair.* 2007. V. 6. P. 383–395.
<https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2006.12.010>
24. Conde F., San-Segundo P.A. Role of Dot1 in the response to alkylating DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae*: Regulation of DNA damage tolerance by the error-prone polymerases Polzeta/Rev1 // *Genetics.* 2008. V. 179. P. 1197–1210.
<https://doi.org/10.1534/genetics.108.089003>

Reparative Chromatin Assembly Plays an Important Role in Genome Stability

I. I. Skobeleva¹, T. A. Evstyukhina^{1, 2}, E. A. Alekseeva^{1, 2, *}, A. V. Toroshchina¹,
V. T. Peshekhonov^{1, 2}, D. V. Fedorov¹, V. G. Korolev^{1, 2}

¹Petersburg Nuclear Physics Institute Named by B.P. Konstantinov of National Research Centre “Kurchatov Institute”,
Gatchina, 188300 Russia

²Kurchatov Genome Center — Petersburg Nuclear Physics Institute, Gatchina, 188300 Russia
*e-mail: alekseeva_ea@pnpi.nrcki.ru

When DNA repair is completed, the processes associated with the restoration of the normal chromatin structure play an important role. Incorrect chromatin assembly can lead to genomic rearrangements, which, in turn, can cause the development of many diseases, including cancer. Previously, we showed that violations of the correct assembly of nucleosomes and their remodulation during the reparative assembly of chromatin lead to an increased level of mutagenesis. In this work, we have shown that the *asf1Δ* mutation has a constitutively hyperactivated Rad53 kinase, which causes disorganization of the chromatin structure and significantly changes the spectrum of spontaneous reparative mutations. Violation of the binding site of the Rad9 adaptive protein to DNA as a result of inactivation of the *DOT1* gene eliminates *hif1Δ*-specific mutagenesis, which is a consequence of incorrect reparative assembly of nucleosomes. The absence of the Rad9 protein under normal growth conditions and when treated with low doses of UV rays leads to aberrant activation of the RNR complex. At the same time, a further increase in the dose of UV radiation practically does not affect the expression of *RNR3*. These results confirm that correct chromatin assembly is critical for the normal functioning of the genome.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*, *RAD9* gene, *DOT1* gene, UV-induced mutagenesis, RNR complex.