

РОЛЬ РАЗЛИЧНЫХ СУБЪЕДИНИЦ РЕМОДЕЛИРУЮЩЕГО КОМПЛЕКСА INO80 В РЕПАРАЦИОННОЙ СБОРКЕ ХРОМАТИНА У ДРОЖЖЕЙ *Saccharomyces cerevisiae*

© 2024 г. Т. А. Евстюхина^{1, 2}, Е. А. Алексеева^{1, 2, *}, И. И. Скобелева¹,
В. Т. Пешехонов^{1, 2}, 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@npi.nrcki.ru

Поступила в редакцию 13.12.2023 г.

После доработки 02.02.2024 г.

Принята к публикации 12.02.2024 г.

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. Действие факторов ремоделирования завершает репарацию хроматина. Ремоделирующий комплекс хроматина дрожжей INO80 играет важную роль в архитектуре хроматина. Мы использовали индуцированный мутагенез и ПЦР в реальном времени для изучения роли INO80 в репарационной сборке хроматина. У двойных мутантов *ies5Δ hsm3Δ (hif1Δ)* дефекты структуры нуклеосом, вызванные мутациями *hsm3Δ* и *hif1Δ*, приводят к гиперчувствительности клеток к УФ-облучению и исчезновению *hsm3-* и *hif1-*специфического мутагенеза. Двойные мутанты, несущие мутацию *nhp10Δ* и мутацию *hsm3Δ* или *hif1Δ*, были неотличимы от одиночного мутанта по летальному эффекту УФ-облучения, однако высокий УФ-индуцированный мутагенез, характерный для всех мутаций, исчезал. Таким образом, мы обнаружили, что мутации в генах, контролирующих субъединицы комплекса INO80, могут проявлять сильные взаимодействия с мутациями в генах гистоновых шаперонов. Была подтверждена гипотеза о том, что белок Him1 выполняет шаперонную функцию в процессе репаративной сборки хроматина.

Ключевые слова: комплекс INO80, *Saccharomyces cerevisiae*, ген *IES5*, ген *NHP10*, УФ-индуцированный мутагенез.

DOI: 10.31857/S0016675824070023 **EDN:** BILQZP

Геном эукариот упакован в хроматин в виде ядерных нуклеосомных частиц, содержащих ядро октамера гистонов, обернутое примерно дважды 147 парами оснований ДНК [1]. Гистоны — это сильно заряженные основные белки, которые могут связываться с различными белками и нуклеиновыми кислотами. Для предотвращения неспецифического взаимодействия гистонов используются шапероны, которые помогают регулировать их правильную укладку в нуклеосомах [2]. Было показано, что посттрансляционное ацетилирование N-концевых хвостов гистонов является важным механизмом, с помощью которого клетки регулируют доступность хроматина [3]. Известно, что в ходе эксцизионной репарации нуклеотидов (НЭР) вновь репарированная ДНК собирается в хроматин

[4] при помощи гистоновых шаперонов Asf1, CAF-1 и комплекса NuB4 [4, 5].

Ремодуляторы хроматина — это специализированные мультибелковые машины, которые могут изменять структуру, состав и расположение нуклеосом в ДНК. Ремоделирующие комплексы (РМК) по-разному влияют на структуру хроматина. Эукариоты содержат как минимум пять семейств РМК: SWI/SNF, ISWI, NURD, INO80 и SWR1. Все РМК содержат АТФазные субъединицы, которые имеют очень похожие АТФазные домены. С-концы этих белков имеют уникальные домены, которые определяют их специфическое связывание или регуляцию. Ферментативная активность этих комплексов приводит к изменению положения нуклеосом вдоль ДНК, увеличению доступности ДНК на

поверхности нуклеосомы и/или обмену гистоновых белков внутри нуклеосом [6, 7].

Комплекс INO80 представляет собой эволюционно консервативный АТФ-зависимый комплекс ремоделирования хроматина, который первоначально был описан как участвующий в транскрипции и репарации ДНК [8–11]. В дрожжах *S. cerevisiae* INO80 необходим для адекватного процессинга репликативных вилок в клетках после обработки метилметансульфонатом вследствие его роли в толерантности к повреждениям ДНК [12]. Было показано, что INO80 необходим для эффективного привлечения Rad18, который инициирует безошибочный путь пострепликативной репарации. Таким образом, INO80 является регулятором толерантности к повреждениям ДНК во время репликации [13].

Комплекс INO80 у *S. cerevisiae* состоит из 15 различных субъединиц: Ino80, Rvb1, Rvb2, Arp4, Arp5, Arp8, Act1, Taf14, Nhp10, Ies1, Ies2, Ies3, Ies4, Ies5 и Ies6 [12]. В дополнение к каркасу Ino80–Ies2 были идентифицированы четыре топологических модуля: Nhp10–Ies1–Ies3–Ies5 (Nhp10-модуль), Arp4–Arp8–Act1–Taf14–Ies4 (Arp8-модуль), Rvb1–Rvb2 (Rvb1/2-модуль) и Arp5–Ies6 (Arp5-модуль). Сборка Arp5–Ies6 необходима для сопряжения гидролиза АТФ с продуктивным движением нуклеосом [14]. Функция модуля Arp5 важна для стимулированного нуклеосомами гидролиза АТФ и ремоделирования хроматина [15], что подтверждает идею о том, что модуль Arp5 функционирует как комплекс нуклеосома/гистон–шаперон и посредник ремоделирования, который связывается с ДНК. Модуль Nhp10 INO80 представляет собой модуль связывания нуклеосом с высоким сродством. Nhp10 представляет собой HMG2-box белок, который, как известно, связывает искаженную ДНК [16, 17]. Nhp10–Ies3–Ies5 тесно связан с ДНК и нуклеосомами, что позволяет предположить, что этот модуль способствует высокоаффинному нацеливанию INO80. Однако модуль Nhp10 не оказывал влияния на активность АТФазы и способность перемещать нуклеосомы, что позволяет предположить, что он не является частью основной ремоделирующей активности [12]. Таким образом, эти данные позволяют предположить, что модули Arp8 и Arp5 участвуют в реакции ремоделирования, тогда как модуль Nhp10 способствует высокоаффинному распознаванию ДНК или нуклеосом [12].

Комплекс NuB4 взаимодействует с шапероном Asf1p, который контролирует сборку хроматина. Это взаимодействие эволюционно консервативно и наблюдается у множества организмов [18–21]. Hat1 — каталитическая субъединица комплекса NuB4, в который входят Hat1p, Hat2p и Hif1p [22–23]. Hat2p обладает активностью шаперона гистонов и, как полагают, облегчает взаимодействие различных комплексов NuB4 с гистонами [24–27].

Hif1p является членом семейства гистоновых шаперонов N1 и специфически связывается с гистонами H3 и H4. Hif1p может играть роль в укладке гистонов на ДНК, что позволяет предположить, что Hat1p может быть непосредственно вовлечен в процесс сборки хроматина [22]. Комплекс NuB4 физически взаимодействует с Hsm3p, который мы ранее идентифицировали как функциональную субъединицу комплекса NuB4 [5, 28–30]. Ранее было показано, что инактивация субъединиц Hif1 и Hsm3 комплекса NuB4 приводит к снижению экспрессии гена *RNR3*, кодирующего субъединицу рибонуклеотидредуктазного комплекса RNR [5]. В настоящем исследовании мы сосредоточились на процессах, которые происходят во время репаративной сборки хроматина в дрожжевых клетках. Наши результаты впервые показали, что мутации в генах, контролирующих ремодуляторы хроматина, могут проявлять сильное взаимодействие с мутациями в генах гистоновых шаперонов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Штаммы

Делеции генов получали путем ПЦР-опосредованного разрушения генов с использованием специфических маркеров [31]. Все 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 данном исследовании, представлены в табл. 1.

Получение штаммов

Для разрушения открытой рамки считывания гена *IES5* (*YER092W*) клетки штамма дрожжей дикого типа (LMG-3031) трансформировали фрагментом ДНК, содержащим маркер *NatMX*, с фланкирующими нуклеотидными последовательностями, гомологичными флангам гена *IES5*. Фрагмент генерировали путем ПЦР-амплификации с праймерами IES5-1 (5'-TGACTGCGATGACTCTAGCG-3') и IES5-2 (5'-CGGTTTAAGCCACATGTTAGG-3') и ДНК, выделенной из штамма KFY-827 в качестве матрицы. Трансформанты с делецией гена *IES5* отбирали по их устойчивости к кланату с использованием полной среды, содержащей нурсеотрицин в концентрации 20 мкг/мл. Разрушение гена *IES5* было подтверждено с помощью ПЦР.

Для разрушения открытой рамки считывания гена *IES6* (*YEL044W*) клетки штамма дрожжей дикого типа (LMG-3031) трансформировали фрагментом ДНК, содержащим маркер *KanMX*, с фланкирующими нуклеотидными последовательностями,

Таблица 1. Штаммы дрожжей, использованные в работе

Штамм	Генотип	Источник
LMG-3031	<i>MATα ade2Δ-248 ura3-160, 188 leu2-3, 112 trp1</i>	Наша коллекция
TAE-200	<i>MATα ade2Δ-248 ura3-160, 188 leu2-3, 112 trp1 ies5Δ</i>	Получены в ходе исследования
TAE-201	<i>MATα ade2Δ-248 ura3-160, 188 leu2-3, 112 trp1 nhp10Δ</i>	»
TAE-203	<i>MATα ade2Δ-248 ura3-160, 188 leu2-3, 112 trp1 ies5Δ hsm3Δ</i>	»
TAE-204	<i>MATα ade2Δ-248 ura3-160, 188 leu2-3, 112 trp1 ies5Δ hif1Δ</i>	»
TAE-205	<i>MATα ade2Δ-248 ura3-160, 188 leu2-3, 112 trp1 nhp10Δ hsm3Δ</i>	»
TAE-206	<i>MATα ade2Δ-248 ura3-160, 188 leu2-3, 112 trp1 nhp10Δ rad2Δ</i>	»
LMG-352	<i>MATα ade2Δ-248 ura3-160, 188 leu2-3, 112 trp1 ies5Δ rad2Δ</i>	»
EAA-1	<i>MATα ade2Δ-248 ura3-160, 188 leu2-3, 112 trp1 rpd3Δ</i>	Наша коллекция
EAA-2	<i>MATα ade2Δ-248 ura3-160, 188 leu2-3, 112 trp1 ies5Δ rpd3Δ</i>	Получены в ходе исследования
TAE-202	<i>MATα ade2Δ-248 ura3-160, 188 leu2-3, 112 trp1 ies6Δ</i>	»
TAE-207	<i>MATα leu2-3, 112 ade2-192 ies6Δ</i>	»
TAE-208	<i>MATα leu2-3, 112 ade2-192 ies6Δ/MATα leu2-3, 112 ade2-192 ies6Δ</i>	»
TAE-209	<i>MATα leu2-3, 112 ade2-192/MATα leu2-3, 112 ade2-192</i>	»

гомологичными флангам гена *IES6*. Фрагмент генерировали путем ПЦР-амплификации с праймерами *IES6-1* (5'-GGCTCTCTGTGCGAAGGAAG-3') и *IES6-2* (5'-GAGACTGGCATCCATGCATG-3') и ДНК, выделенной из штамма KFY-1437 в качестве матрицы. Трансформанты с делецией гена *IES6* отбирали по их устойчивости к генетицину с использованием полной среды, содержащей генетицин в концентрации 200 мкг/мл. Разрушение гена *IES6* было подтверждено с помощью ПЦР.

Для разрушения открытой рамки считывания гена *NHP10* (*YDL002C*) клетки штамма дрожжей дикого типа (LMG-3031) трансформировали фрагментом ДНК, содержащим маркер *NatMX*, с фланкирующими нуклеотидными последовательностями, гомологичными флангам гена *NHP10*. Фрагмент генерировали путем ПЦР-амплификации с праймерами *NHP10-1* (5'-GCTAAGAAATCTTGTGCACGA-3') и *NHP10-2* (5'-TAGGAATCGTCTGCCCCACGT-3') и ДНК, выделенной из штамма KFY-1803 в качестве матрицы. Трансформанты с делецией гена *NHP10* отбирали по их устойчивости к кланату с использованием полной среды, содержащей нурсеотрицин в концентрации 20 мкг/мл. Разрушение гена *NHP10* было подтверждено с помощью ПЦР.

Питательные среды

Состав минимальной среды, использованной в качестве селективной, а также среды D для выращивания культур и учета выживаемости приведены

в [31]. Специальную среду с добавлением 96%-ного этанола (15 мл/л) и 40%-ной глюкозы (4 мл/л), включающую рост мутантов с дыхательной недостаточностью, использовали для оценки индуцированного мутагенеза в локусах *ADE4–ADE8* [32]. Для определения частоты спонтанных мутаций устойчивости к канаванину методом упорядоченного посева использовали среду минимального состава с добавлением аминокислот и азотистых оснований, необходимых для роста тестируемых штаммов, и различных концентраций канаванина. Во флукуационном методе медиан использовали среду того же состава, но обогащенную полным набором аминокислот (за исключением аргинина) и азотистых оснований и содержащую более высокие концентрации канаванина [33].

Чувствительность к УФ-излучению

Тесты на выживаемость клеток проводили путем выращивания в течение ночи культуры соответствующего штамма в жидкой YPD при 30 °C. Клетки промывали и ресуспендировали в воде с плотностью 1×10^7 кл./мл. Суспензию клеток облучали УФ-лампой БУВ-30 (диапазон УФ-С) с мощностью дозы на верхнем уровне 1.4 Дж/м²с (для штаммов дикого типа, *ies5Δ*, *nhp10Δ*, *ies6Δ*, *rpd3Δ*, *ies5Δ rpd3Δ*, *ies5Δ him1Δ*, *ies5Δ hsm3Δ*, *ies5Δ hif1Δ*, *nhp10Δ him1Δ*, *nhp10Δ hsm3Δ* и *nhp10Δ hif1Δ*) и на нижнем уровне – 0.21 Дж/м²с (для штаммов *rad2Δ*, *rad2Δ ies5Δ* и *rad2Δ nhp10Δ*). Аликвоты отбирали после различных доз облучения, разбавляли и помещали на

чашки с YPD для определения количества выживших [5].

Мутационные тесты

Мутационные тесты проводили путем выращивания в течение ночи культуры соответствующего штамма в жидкой YPD при 30 °С. Клетки промывали и ресуспендировали в воде с плотностью 1×10^7 кл./мл. Клетки облучали УФ-лампой БУВ-30. Аликвоты отбирали после различных доз облучения, разбавляли и помещали на чашки с YPD для определения количества выживших. Для определения частоты мутаций неразведенные аликвоты высевали на среду YPD со спиртом вместо глюкозы, состав которой был описан ранее [32].

Спонтанный мутагенез определяли с использованием стандартного метода медиан (флуктуационный тест), который регистрирует в основном ошибки репликации [34]. После трехдневной инкубации отбирали 12 отдельных колоний, каждую из которых суспендировали в 1 мл воды и высевали на селективную среду с канавагином в концентрации, исключающей возможность роста чувствительных к канавагину клеток. При оценке количества высеянных клеток мы разбавляли суспензии и высевали их на полную среду. После инкубации в течение трех-четырех дней подсчитывали количество колоний, устойчивых к канавагину, и общее количество колоний, чувствительных к канавагину, на чашке Петри. Частоту возникновения спонтанных мутаций оценивали по специальной формуле [34].

В других экспериментах скорость спонтанных мутаций устойчивости к канавагину оценивали по методу упорядоченного посева Хромова-Борисова [35]. Этот метод позволяет измерять скорость репаративного мутагенеза. В этих экспериментах тестируемые дрожжевые культуры выращивали на чашках с полной средой в течение суток. Затем готовили 5 мл суспензии (1×10^6 кл./мл). Специальный репликатор на 150 штырей был погружен в эту суспензию и перенесен на чашку Петри со средой, содержащей канавагин. Репликатор переносил 150 равных капель дрожжевой суспензии (около 2 мкл каждая) на равных расстояниях друг от друга, каждая капля содержала приблизительно 2000 клеток. Концентрация канавагина для оценки скорости мутаций устойчивости к антибиотику была определена в специальных предварительных экспериментах для всех штаммов и составила 50 мг/л. Мутанты имеют более быстрый рост, который проявляется в виде “бородавок” на пятнах с ограниченным ростом исследуемой культуры. После 14–15 дней инкубации подсчитывали бородавки мутантов, устойчивых к канавагину, и общее количество клеток. Последнее было сделано после смыва клеток с ряда реплик капель, лишенных бородавок. Частоты

мутаций на одно деление клеток определяли путем деления числа бородавок на общее количество клеток на чашке. Результаты представлены как средние значения 3–5 независимых экспериментов с 95%-ным доверительным интервалом.

ПЦР в реальном времени

Для проведения ПЦР в реальном времени была использована система детекции RT-PCR CFX96 (Bio-Rad, Великобритания). Реакции проводили в 25 мкл объемах, 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 мкл кДНК и 0.1 (2 мМ) соответствующих праймеров (праймеры для гена *RNR3*: For*RNR3* 5'-ACACCTTTCATGGTTTATAAG-3' и Rev*RNR3* 5'-CGACGATTTCACAACATAA-3'; для гена *ACT1*: For*ACT1* 5'-GAAGGTCAAGATCATTGC-3' и Rev*ACT1* 5'-GTTGGAAGGTAGTCAAAG-3').

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

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 стандартная ошибка среднего (SEM) по крайней мере от трех повторов, а статистические различия определялись с помощью *t*-критерия Стьюдента. Значимость определяли на уровне $p < 0.05$ [5].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Сборка хроматина накладывает ограничения на многие клеточные процессы, требующие доступа к хромосомной ДНК. Гистоновые шапероны играют ключевую роль в динамике хроматина, контролируя процессы его разборки и сборки [36–37]. В отличие от репликативной сборки хроматина процесс репарационной сборки менее изучен. Это связано с тем, что еще не все участники выявлены и не все связи между этапами этого процесса установлены. Показано, что мутанты по гену *INO80* влияют на процессы репарации у дрожжей [9]. Мутации некоторых компонентов комплекса INO80 проявляют гиперчувствительность к генотоксическим агентам [8, 38, 39].

Ранее мы показали, что анализ индуцированного мутагенеза у различных мутантов по репарации может служить тонким инструментом для изучения процесса репарационной сборки хроматина [5, 40, 41]. Как отмечалось ранее, *Ies5*, *Ies6* и *Nhp10* являются компонентами комплекса ремоделирования хроматина INO80. Роль генов *NHP10*, *IES5* и *IES6*, кодирующих субъединицы двух модулей комплекса INO80, в генетическом контроле мутационного процесса ранее не изучалась. Мы получили нулевые мутанты по этим генам и охарактеризовали их чувствительность к УФ-излучению, а также влияние мутаций в генах *NHP10*, *IES5* и *IES6* на частоту УФ-индуцированных и спонтанных мутаций.

IES6

Потеря каталитической субъединицы *Ies6* или *Ino80* приводит к быстрому увеличению плоидности. Одним из путей к полиплоидии является аномальная сегрегация хромосом из-за aberrантной структуры центромеры [42]. Поэтому мы попытались изучить эффекты мутации *ies6Δ*, когда мутация является гомозиготной в диплоидных клетках, несущих мутацию *ade2-192* также в гомозиготном состоянии. *ade2-192* представляет собой редко ревертирующую миссенс-мутацию. Частота спонтанных реверсий у диплоидного штамма дикого типа, гомозиготного по мутации *ade2-192*, составила $2.9 \pm 0.5 \times 10^{-8}$. У диплоида, гомозиготного по мутациям *ies6Δ* и *ade2-192*, эта частота составила $1.4 \pm 0.4 \times 10^{-8}$. Таким образом, мутация *ies6Δ* снижает частоту спонтанного мутагенеза примерно в 2 раза. Для дальнейшего тестирования выживаемости мутанта *ies6Δ ade2-192* мы провели эксперименты с УФ-светом. Было обнаружено, что этот мутант проявлял такую же чувствительность к УФ, как и штамм дикого типа (рис. 1).

Далее мы проверили, как мутация гена *IES6* влияет на УФ-индуцированный мутагенез. Как показано на рис. 1, мутант *ies6Δ ade2-192* продемонстрировал уровень УФ-индуцированного мутагенеза, свойственный штамму дикого типа. Таким образом, мутация *ies6Δ* не оказывает существенного влияния на выживаемость и мутагенез дрожжевых клеток после УФ-облучения.

IES5 и *NHP10*

В настоящей работе проведено сравнительное исследование генетических свойств мутаций *ies5Δ* и *nhp10Δ* и их взаимодействия с делеционными мутациями в генах *HSM3* и *HIF1*, которые кодируют субъединицы комплекса NuB4 и принимают участие в репаративной сборке хроматина. Сначала мы протестировали чувствительность к УФ-излучению штамма дикого типа и одиночных мутантов *ies5Δ* и *nhp10Δ*. Как видно из рис. 2, а, одиночный мутант

продемонстрировал чувствительность к УФ, сравнимую с чувствительностью штамма дикого типа. Мутация *ies5Δ* в сочетании с *rad2Δ* не приводила к изменению устойчивости к УФ-излучению клеток двойного мутанта *ies5Δ rad2Δ* по сравнению с клетками одиночного мутанта *rad2Δ* (рис. 3). На основании полученных данных можно сделать вывод, что мутации в гене *IES5*, кодирующей субъединицу модуля Nhp10 комплекса INO80, не изменяют устойчивости клеток к УФ-излучению и не влияют на НЭР. В отличие от *ies5Δ*, мутант *nhp10Δ* показал незначительное увеличение чувствительности к УФ-излучению (рис. 2, б). Двойной мутант *nhp10Δ rad2Δ* значительно отличался от одиночного мутанта *rad2Δ* (рис. 3). Таким образом, мутанты по генам, кодирующим субъединицы одного модуля

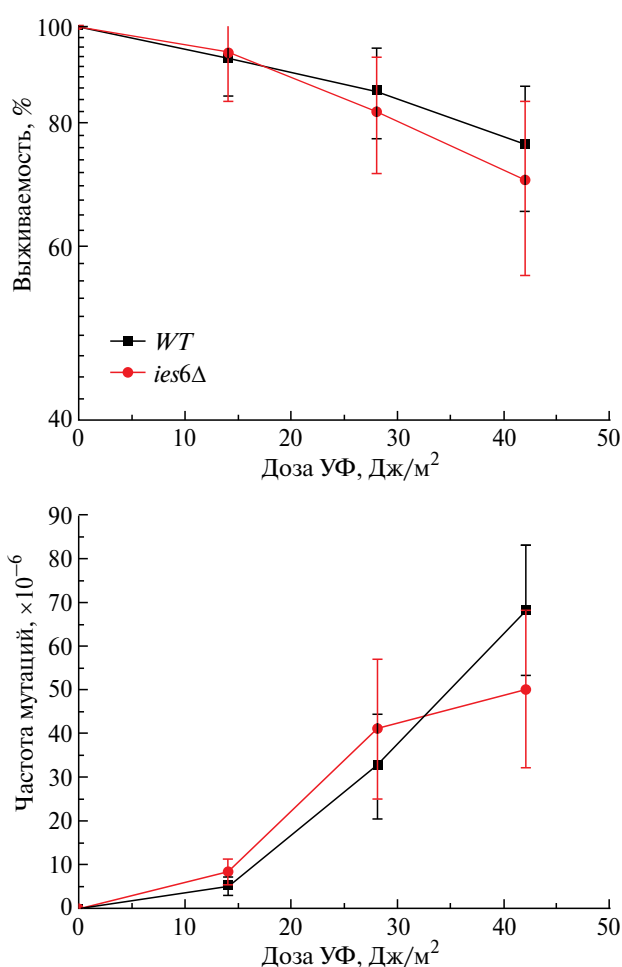


Рис. 1. Чувствительность к УФ-свету и частота УФ-индуцированного мутагенеза в локусе *CAN1* у штамма дикого типа и мутантного диплоидного штамма *ies6Δ* при обработке различными дозами ультрафиолетового излучения. На графиках показаны стандартные ошибки среднего значения ($\pm$ SEM), полученные в результате пяти независимых экспериментов.

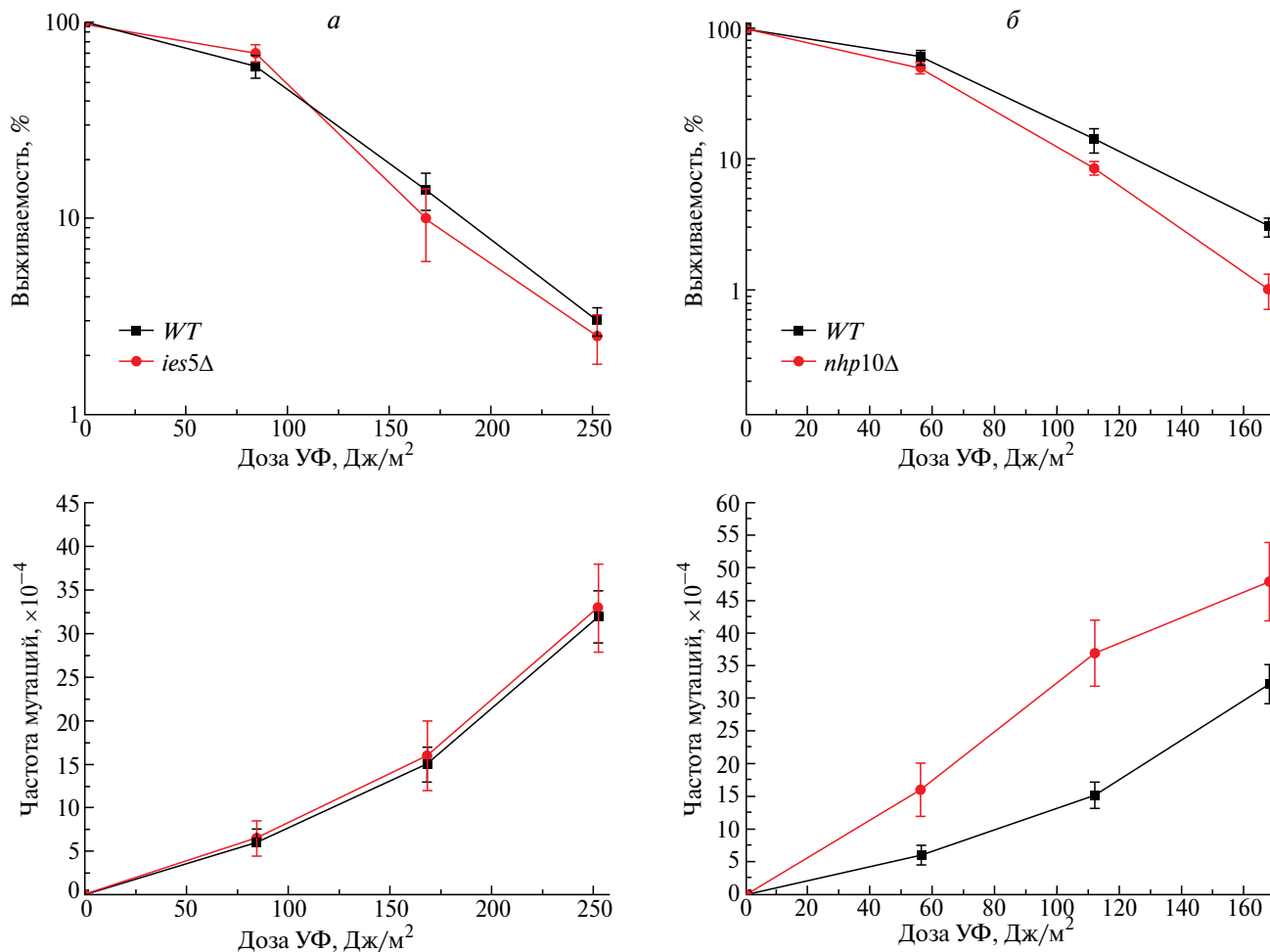


Рис. 2. Чувствительность к УФ-свету и частота УФ-индуцированного мутагенеза в локусах *ADE4–ADE8* у штамма дикого типа и мутантного штамма *ies5Δ* (а) и мутантного штамма *nhp10Δ* (б) при обработке различными дозами ультрафиолетового излучения.

комплекса INO80, по-разному влияют на УФ-чувствительность дрожжевых клеток.

Далее была исследована возможная роль *Ies5* и *Nhp10* в мутационном процессе. Мы решили сравнить спонтанный мутагенез у мутантов *ies5Δ* и *nhp10Δ* со штаммом дикого типа. При изучении частоты возникновения спонтанных мутаций использовали два разных метода: флуктуационный тест (метод “медианы Коулсона – Ли”), который в основном позволяет определить уровень спонтанного репликативного мутагенеза, и метод упорядоченного посева, по результатам которого можно судить об уровне репаративного мутагенеза [5]. В обоих случаях была рассчитана частота мутаций гена *CAN1*, приводящих к устойчивости к канаваину. Из табл. 2 видно, что наличие в клетках мутации *ies5Δ* приводит к снижению скорости спонтанного репликативного мутагенеза. Поскольку метод упорядоченного посева одновременно выявляет репликативный и репаративный спонтанный

мутагенез, вклад репаративного мутагенеза в общую скорость спонтанного мутагенеза у мутанта *ies5Δ* составит около 100%. Учитывая это обстоятельство, можно заключить, что мутация *ies5Δ* увеличивает скорость репаративного мутагенеза примерно в два раза. Мутация *nhp10Δ* не изменяла скорость репликативного спонтанного мутагенеза, но увеличивала репаративный мутагенез в 6–7 раз (табл. 2).

Для оценки влияния мутаций *ies5Δ* и *nhp10Δ* на УФ-индуцированный мутагенез мы измерили частоту прямых мутаций в локусах *ADE4–ADE8*, индуцированных УФ-лучами у штамма дикого типа и одиночных мутантов *ies5Δ* и *nhp10Δ*. Данные, представленные на рис. 2,б, позволяют предположить, что мутация *ies5Δ* не влияет на частоту УФ-индуцированного мутагенеза. Частота УФ-индуцированного мутагенеза у двойного мутанта *ies5Δ rad2Δ* практически не отличалась от одиночного *rad2Δ* (рис. 3). В отличие от *ies5Δ* мутант *nhp10Δ* усиливал

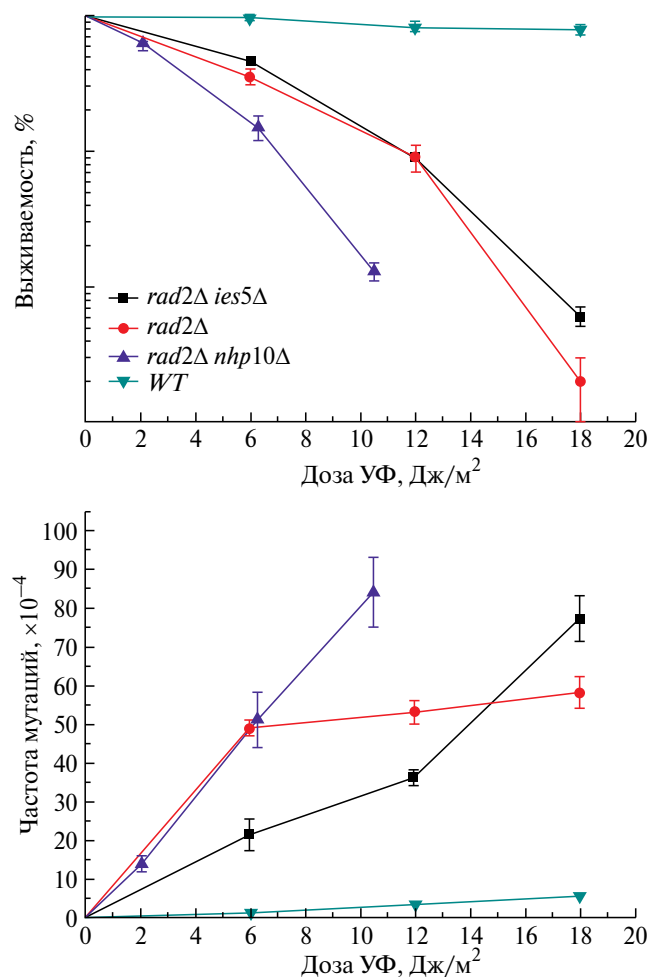


Рис. 3. Чувствительность к УФ-свету и частота УФ-индуцированного мутагенеза в локусах *ADE4–ADE8* у штамма дикого типа и мутантных штаммов *rad2Δ*, *rad2Δ ies5Δ* и *rad2Δ nhp10Δ* при обработке различными дозами ультрафиолетового излучения.

УФ-индуцированный мутагенез по сравнению со штаммом дикого типа (рис. 2,б). Двойной мутант *nhp10Δ rad2Δ* проявлял гиперчувствительность по сравнению с одиночным мутантом. Это взаимодействие было аддитивным, что указывает на разницу в механизмах чувствительности к УФ-излучению, опосредованную мутациями *nhp10Δ* и *rad2Δ* (рис. 3). Однако при равной выживаемости частота

мутаций у мутанта *nhp10Δ* и штамма дикого типа была одинаковой. Такая же картина наблюдалась для мутантов *rad2Δ* и *nhp10Δ rad2Δ*.

Ранее было показано, что комплекс NuB4 может принимать непосредственное участие в процессе сборки хроматина [5, 22]. На основании полученных данных мы предположили, что инактивация субъединиц Hif1 и Hsm3 комплекса NuB4 приводит к неправильной сборке нуклеосом, что влияет на активацию киназы Rad53 [5]. Модуль Nhp10 способствует высокоаффинному связыванию с ДНК или нуклеосомой [12]. Исходя из нашего предположения, если между белками Hsm3 и Hif1 существует генетическое взаимодействие с белками Ies5 и Nhp10, то можно ожидать изменения фенотипических проявлений их мутаций в двойных мутантах. С помощью этого анализа мы стремились подтвердить, что мутации *hsm3Δ* и *hif1Δ* действительно нарушают правильную сборку нуклеосом.

Одиночные мутанты *hif1Δ* и *hsm3Δ* показали такую же чувствительность к УФ, как и штамм дикого типа [5], а также одиночный *ies5Δ*. Однако двойной мутант *hsm3Δ ies5Δ* показал гиперчувствительность к УФ-облучению (рис. 4,а). Точно такую же природу взаимодействия показали мутации *hif1Δ* и *ies5Δ* (рис. 4,а). В отличие от мутанта *ies5Δ*, одиночный *nhp10Δ* проявлял гиперчувствительность к УФ-облучению, и оба двойных *hif1Δ nhp10Δ* и *hsm3Δ nhp10Δ* ничем не отличались от одиночного *nhp10Δ* (рис. 4,б). Таким образом, дефекты структуры нуклеосомы, вызванные мутациями *hif1Δ* и *hsm3Δ*, не приводят к дальнейшему увеличению УФ-чувствительности мутанта *nhp10Δ*.

Дальнейший генетический анализ изученных мутантов был проведен для понимания взаимодействия соответствующих белковых продуктов в УФ-индуцированном мутагенезе. Характерной особенностью мутантов *hif1Δ* и *hsm3Δ* является высокий УФ-индуцированный мутагенез [5], тогда как *ies5Δ* по этому показателю не отличается от штамма дикого типа. Как видно из рис. 4,а, мутация *ies5Δ* полностью подавляет характерный мутагенез *hif1Δ* и *hsm3Δ*, частота УФ-индуцированных мутаций у этих мутантов даже ниже по сравнению со штаммом дикого типа. Мутация *nhp10Δ* снижала характерный для *hif1Δ* и *hsm3Δ* мутагенез до уровня штамма дикого типа, в то же время подавлялся

Таблица 2. Спонтанный мутагенез устойчивости к канаванину

Штаммы	Упорядоченный посев, $\times 10^{-7}$	Флуктуационный тест, $\times 10^{-7}$
WT	3.0 ± 0.24	3.0 ± 0.16
<i>ies5Δ</i>	4.4 ± 0.7	>1
<i>ies6Δ / ies6Δ</i>	2.7 ± 0.7	>1
<i>nhp10Δ</i>	19.8 ± 3.4	–

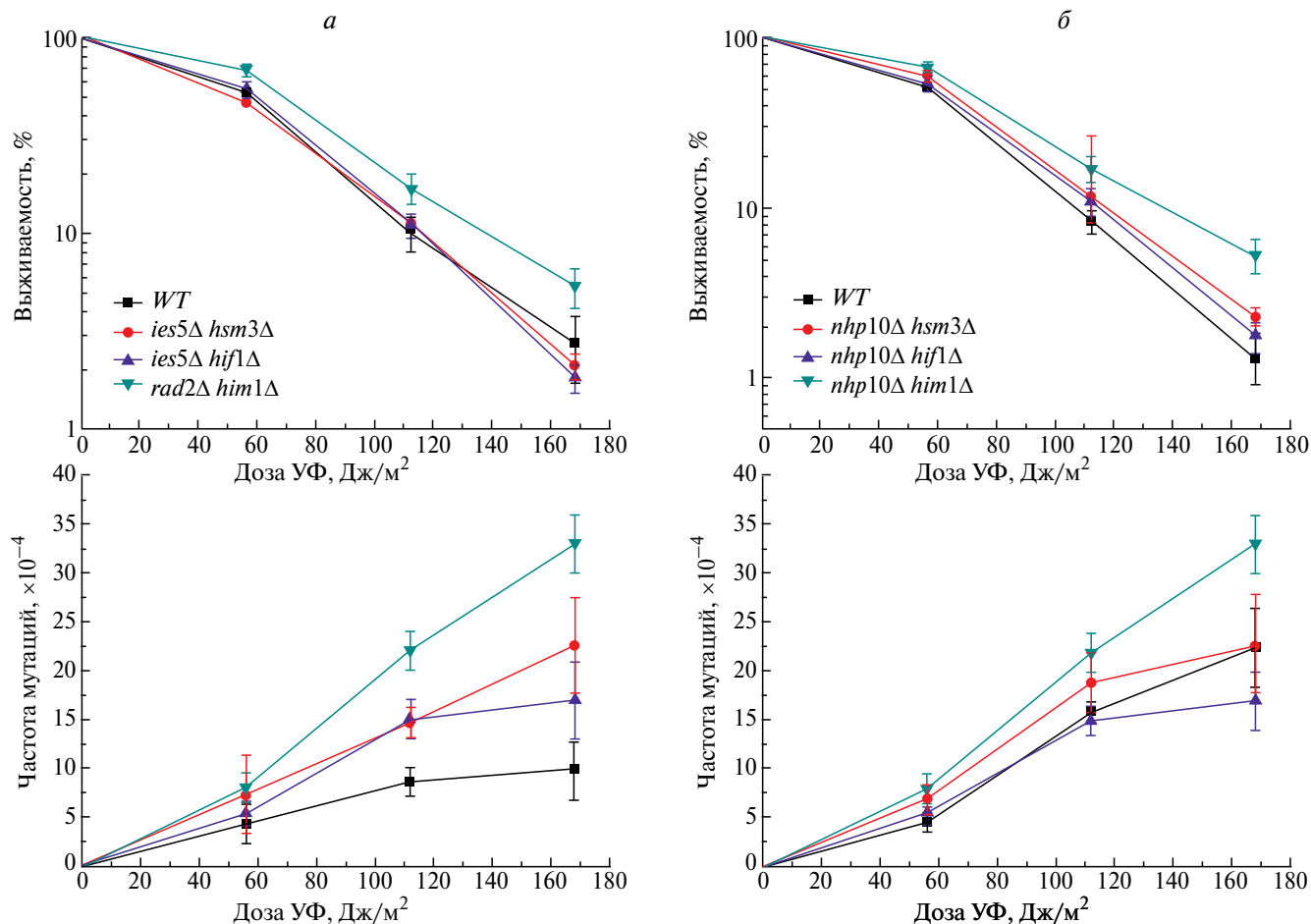


Рис. 4. Чувствительность к УФ-свету и частота УФ-индуцированного мутагенеза в локусах *ADE4–ADE8* у штамма дикого типа и мутантных штаммов *ies5Δ hsm3Δ*, *ies5Δ hif1Δ* и *ies5Δ him1Δ* (а) и *nhp10Δ hsm3Δ*, *nhp10Δ hif1Δ* и *nhp10Δ him1Δ* (б) при обработке различными дозами ультрафиолетового излучения.

nhp10-зависимый мутагенез (рис. 4, б). В совокупности эти результаты подтверждают нашу гипотезу о том, что мутации *hif1Δ* и *hsm3Δ* приводят к некорректной сборке нуклеосом и указывают на то, что ремоделирующий комплекс INO80 не может редактировать эти искажения структуры нуклеосом.

Для завершения сборки хроматина необходимо удалить ацетильные группы с N-концевых хвостов гистонов. Для этого клетка использует гистондеацетилазы (HDAC), одной из таких HDAC является комплекс RPD3. У *S. cerevisiae* этот комплекс представляет собой HDAC класса I и существует в виде комплексов Rpd3L или Rpd3S, оба из которых имеют общие субъединицы Rpd3, Sin3 и Ume1 [43, 44], которые могут проявлять свойства гистоновой шаперона во время репаративной сборки хроматина [45]. Было решено изучить взаимодействие мутаций *ies5Δ* и *rpд3Δ*. Чтобы оценить эффект мутации в гене, кодирующем субъединицу Rpd3 комплекса RPD3, мы разрушили ген *IES5* в одиночном мутанте *rpд3Δ*. Как показано на рис.

5, оба одиночных мутанта не отличались по выживаемости от двойного мутанта *ies5Δ rpд3Δ*. Однако УФ-индуцированный мутагенез у двойного мутанта был подавлен и находился на том же уровне, что и у мутанта *ies5Δ him1Δ* (рис. 4, 5). Эти результаты позволяют предположить, что отсутствие деацетилирования вновь собранных нуклеосом препятствует нормальному функционированию комплекса INO80.

Him1 и комплекс INO80

Одиночный мутант *him1Δ* показал большую устойчивость к УФ-излучению по сравнению со штаммом дикого типа [46]. На основании этих данных мы исследовали потенциальные эпистатические связи между мутациями генов *NHP10*, *IES5* и *HIM1*. Мутация *nhp10Δ* подавляет *him1*-зависимую устойчивость к УФ-излучению до уровня одиночного мутанта *nhp10Δ* (рис. 4). Как и в случае с мутантами *hsm3Δ* и *hif1Δ*, мутация *him1Δ* приводила

к гиперчувствительности двойного мутанта *him1Δ ies5Δ* (рис. 4,а).

УФ-индуцированный мутагенез у мутанта *him1Δ* высок, как и у мутантов *hsm3Δ* и *hif1Δ* [45]. Мы создали двойные мутанты *ies5Δ him1Δ* и *nhp10Δ him1Δ* и изучили УФ-индуцированный мутагенез у этих двойных мутантов. Характер взаимодействия мутации *him1Δ* с мутациями *ies5Δ* и *nhp10Δ* при УФ-индуцированном мутагенезе был аналогичен мутациям *hsm3Δ* и *hif1Δ* (рис. 4,б). Таким образом, на основании полученных данных можно заключить, что мутация *him1Δ*, как и мутации *hsm3Δ* и *hif1Δ*, приводит к некорректной сборке нуклеосом.

Экспрессия *RNR3* у мутантов *ies5Δ* и *nhp10Δ*

Ранее мы показали, что причиной усиленно-го УФ-мутагенеза мутантов *hsm3Δ* и *hif1Δ* является промежуточная УФ-индуцированная активация киназы Rad53 [5]. Уровень активации киназы

Rad53 можно определить при помощи уровня экспрессии гена *RNR3*, продукт которого является субъединицей рибонуклеотидредуктазного комплекса RNR, активность которого непосредственно регулируется киназой Rad53 [41]. При самом высоком и самом низком уровнях активации киназы *hsm3*- и *hif1*-специфический мутагенез подавляется [5]. Поскольку мутации *ies5Δ* и *nhp10Δ* подавляют мутагенез, специфичный для *him1Δ*, *hsm3Δ* и *hif1Δ*, было протестировано влияние мутаций *ies5Δ* и *nhp10Δ* на уровень УФ-индуцированной экспрессии гена *RNR3*. Мы облучали УФ-светом мутантные клетки дикого типа, *ies5Δ* и *nhp10Δ* и через 4 часа измеряли уровни мРНК гена *RNR3* в облученных и необлученных клетках. Как видно из рис. 6, уровень мРНК в клетках дикого типа увеличился почти в 2 раза.

У одиночного мутанта *ies5Δ* уровень экспрессии гена *RNR3* был немного снижен по сравнению с уровнем штамма дикого типа (рис. 6,а), что не

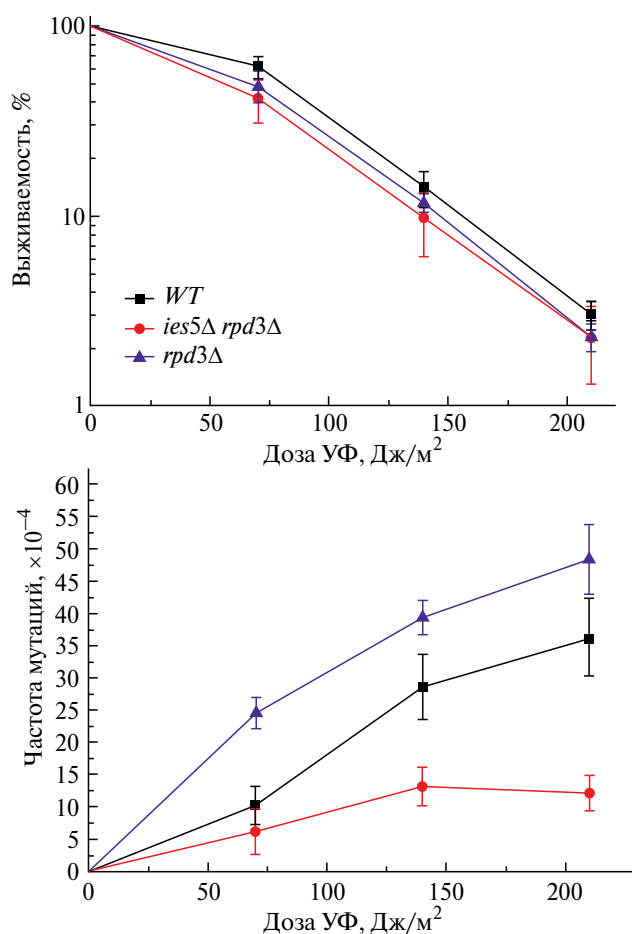


Рис. 5. Чувствительность к УФ-свету и частота УФ-индуцированного мутагенеза в локусах *ADE4–ADE8* штамма дикого типа и мутантных штаммов *ies5Δ rpd3Δ* и *rpд3Δ* при обработке различными дозами ультрафиолетового излучения.

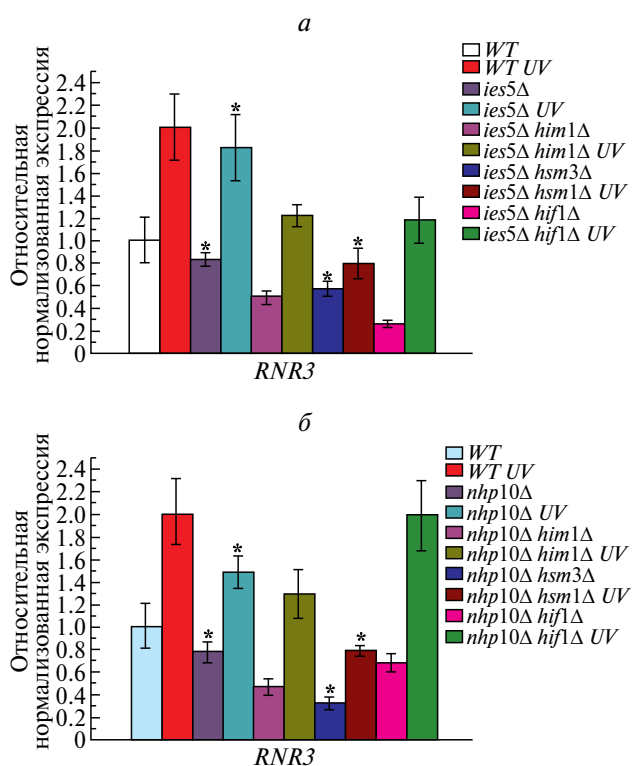


Рис. 6. Гистограммы показывают относительную нормализованную экспрессию гена *RNR3* в штамме дикого типа и мутантных штаммах: *ies5Δ*, *ies5Δ him1Δ*, *ies5Δ hsm3Δ* и *ies5Δ hif1Δ* (а); *nhp10Δ*, *nhp10Δ him1Δ*, *nhp10Δ hsm3Δ* и *nhp10Δ hif1Δ* (б) до и после облучения их ультрафиолетовым светом (после УФ-облучения клетки выдерживали в течение четырех часов при 30° С в термостате для индукции), доза УФ-излучения составляла 252 Дж/м²; * $p < 0.05$, t -критерий Стьюдента.

влияло на частоту УФ-индуцированного мутагенеза. С другой стороны, мутация *nhp10Δ* подавляет уровень экспрессии до промежуточного уровня, что объясняет усиление УФ-индуцированного мутагенеза у этого штамма. Возникает вопрос, почему мутации *ies5Δ* и *nhp10Δ* подавляют *him1*-, *hsm3*- и *hif1*-специфический мутагенез? Аналогичное подавление УФ-специфического мутагенеза мы наблюдали у двойных мутантов *hat1Δ hsm3Δ* и *hsm3Δ hif1Δ* [5]. Hat1 является ключевой субъединицей комплекса NuB4, и ее отсутствие полностью разрушает комплекс, поэтому у мутанта нарушается репаративная сборка нуклеосом. Именно это событие приводит к гиперактивации экспрессии гена *RNR3* у мутанта *hat1Δ*. У двойного мутанта *hsm3Δ hif1Δ* уровень УФ-индуцированной экспрессии гена *RNR3* подавлен до уровня клеток дикого типа без облучения. В этом случае подавление *RNR3* происходит за счет аддитивного эффекта обеих мутаций. В экспериментах с УФ-облучением двойные мутанты *ies5Δ him1Δ*, *ies5Δ hsm3Δ* и *ies5Δ hif1Δ* показали дальнейшее снижение уровней экспрессии *RNR3* по сравнению с одиночным мутантом *ies5Δ*. Согласно этому наблюдению, можно предположить, что у двойных мутантов *ies5Δ him1Δ*, *ies5Δ hsm3Δ* и *ies5Δ hif1Δ* наблюдается аддитивное взаимодействие мутаций. В экспериментах без УФ-облучения мутация *nhp10Δ* более эффективно снижает уровень экспрессии гена *RNR3* по сравнению с мутацией *ies5Δ*. Та же тенденция наблюдалась у двойных мутантов *nhp10Δ him1Δ* и *nhp10Δ hsm3Δ* (рис. 6,б). Однако мутант *nhp10Δ hif1Δ* имел более высокий уровень экспрессии *RNR3* по сравнению с мутантом *ies5Δ hif1Δ* как до, так и после УФ-облучения. При этом уровень экспрессии *RNR3* после облучения достиг уровня штамма дикого типа. Возможно, этот эффект связан, как и в случае с мутацией *hat1Δ*, с полной дисфункцией вновь собранных нуклеосом.

ОБСУЖДЕНИЕ

Было показано, что посттрансляционное ацетилирование N-концевых хвостов гистонов является важным механизмом, с помощью которого клетки регулируют доступность хроматина [3]. Процесс сборки репарационного хроматина имеет ряд отличий от процесса сборки при репликации и менее полно изучен, чем последний. В ряде недавних работ мы попытались расширить наши знания о механизме репарационной сборки хроматина [5, 40, 41]. Ассоциация гистонового шаперона Hif1 с NuB4 стала первым прямым доказательством роли комплекса NAT1 в процессе сборки хроматина [22]. Показано, что Hat1, помимо Hif1 и Hat2, взаимодействует с шаперонами Asf1 и Hsm3 [5, 47]. Ранее мы показали, что инактивация обеих вспомогательных субъединиц NuB4 комплекса Hsm3 и

Hif1 частично подавляет УФ-индуцированную экспрессию генов комплекса RNR, тогда как инактивация обеих субъединиц приводит к ее полному подавлению [5]. Предполагается, что потеря вспомогательных субъединиц комплекса NuB4 при репарационной сборке хроматина приводит к дефектам нуклеосомы.

Эксперименты по взаимодействию мутаций *ies5Δ* и *rpд3Δ* показали, что отсутствие деацетилирования вновь встроенных нуклеосом препятствует нормальному функционированию комплекса INO80, что указывает на то, что ацетилированные нуклеосомы воспринимаются комплексом INO80 как поврежденные и подтверждают роль комплекса RPD3 в репаративной сборке хроматина. Nhp10–Ies3–Ies5 тесно связан с ДНК и нуклеосомы, что позволяет предположить, что этот модуль способствует высокоаффинному нацеливанию INO80 на ДНК. Мы предположили, что дефекты структуры нуклеосомы, возникающие в результате некорректной сборки хроматина, могут препятствовать эффективному связыванию комплекса INO80 с восстановленным хроматином. Для проверки этих гипотез были проведены эксперименты с двойными мутантами, включая мутации *ies5Δ*, *nhp10Δ*, с одной стороны, и мутации *hsm3Δ*, *hif1Δ*, *him1Δ*, с другой стороны. Мутация *nhp10Δ* вызывает гиперчувствительность к УФ-облучению, что указывает на нарушение связывания комплекса INO80 с восстановленным хроматином. У двойных мутантов дефекты структуры нуклеосом, вызванные мутациями *him1Δ*, *hsm3Δ* и *hif1Δ*, существенно не влияют на выживаемость мутанта *nhp10Δ* после УФ-облучения. Возможно, белок Nhp10 обеспечивает соединение комплекса INO80 с ДНК и не играет существенной роли в связывании этого комплекса с нуклеосомой. Одиночная мутация *ies5Δ* не вызывает гиперчувствительности к УФ-облучению, что указывает на нормальное связывание комплекса INO80 с репарированным хроматином. Однако у двойного мутанта дефекты структуры нуклеосомы, вызванные мутациями *him1Δ*, *hsm3Δ* и *hif1Δ*, приводят к гиперчувствительности клеток к УФ-облучению. Мы предполагаем, что белок Ies5, возможно, обеспечивает соединение комплекса INO80 с нуклеосомой и не играет существенной роли в связывании этого комплекса с ДНК. Наши данные о взаимодействии мутации *him1Δ* с мутациями *ies5Δ* и *nhp10Δ*, кодирующими субъединицы ремоделирующего комплекса INO80, подтверждают нашу гипотезу о том, что белок Him1 выполняет шаперонную функцию в процессе репарационной сборки хроматина.

Таким образом, мы впервые продемонстрировали, что мутации в генах, контролирующих ремодуляторы хроматина, могут проявлять сильные взаимодействия с мутациями в генах гистоновых шаперонов.

Ранее мы показали, что одиночные мутации в генах *ISW1*, *ISW2* и *CHD1* слабо влияют на репарационные и мутагенные процессы в дрожжевых клетках. В то же время существуют различия во влиянии этих мутаций на уровни спонтанных мутаций, что указывает на определенную специфичность действия белковых комплексов *ISW1*, *ISW2* и *CHD1* на экспрессию разных генов, контролирующих процессы репарации и мутации у дрожжей [48]. Функция модуля *Arg5* важна для стимулированного нуклеосомами гидролиза АТФ и ремоделирования хроматина [12], поэтому мы не наблюдали влияния инактивации гена *IES6* на индуцированный мутагенез, аналогичного мутациям в генах, кодирующих субъединицы других ремоделирующих комплексов *ISW1*, *ISW2* и *CHD1*. В то же время инактивация различных субъединиц *INO80* влияет на уровень спонтанного мутагенеза (табл. 2), как и мутации в генах, кодирующих упомянутые выше ремодуляторы.

Фосфорилированный *Rad9* взаимодействует с СООН-концевым доменом *Rad53*. Инактивация этого домена устраняет зависимое от повреждения ДНК фосфорилирование *Rad53*, остановку фазы клеточного цикла G2/M и увеличение транскрипции *RNR3* [49]. Ранее мы использовали аллель гена *RAD53* с поврежденной С-терминальной последовательностью. Мутация *rad53+HA-F* не увеличивала экспрессии *RNR3* по сравнению с клетками дикого типа в нормальных условиях роста и после УФ-облучения. В двойном мутанте *rad53+HA-F hsm3Δ* мутаторный фенотип мутанта *hsm3Δ* полностью подавлялся [41]. Таким образом, *Rad9* отвечает за максимальную гиперактивацию киназы *Rad53* при репарации повреждений ДНК. На основании этих данных мы предположили, что искажения структуры нуклеосомы, вызванные отсутствием вспомогательных субъединиц комплекса *NuB4*, ухудшают связывание белка *Rad9* с хроматином, что и приводит к супрессии *hsm3-*, *hif1-* и *him1-*специфического мутагенеза. Роль комплекса *INO80* в этом процессе, по-видимому, состоит в организации архитектуры хроматина, которая способствует эффективному связыванию *Rad9* с хроматином.

Действие факторов ремоделирования завершает репарацию хроматина. Наши результаты показывают, что комплекс *INO80* играет важную роль в этом процессе. Отсутствие белка *Nhp10*, входящего в состав модуля, отвечающего за связывание с ДНК, по-видимому, инактивирует основную функцию комплекса *INO80* и приводит к снижению эффективности систем репарации. Инактивация другой субъединицы этого модуля, *Ies5*, не приводит к заметным изменениям фенотипа клетки. Однако у двойных мутантов, несущих некорректно собранные нуклеосомы и мутации *nhp10Δ* или *ies5Δ*, мы наблюдали большие изменения в

функционировании пострепликативной репарации, выразившиеся в появлении гиперчувствительности к летальному действию УФ-облучения и подавлению мутаторного фенотипа.

Работа выполнена при финансовой поддержке “Курчатовского геномного центра – ПИЯФ” программой развития центров генетических исследований мирового уровня, соглашение № 075-15-2019-1663.

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. Luger K., Mader A.W., Richmond R.K. et al. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution // *Nature*. 1997. V. 389. P. 251–260. <https://doi.org/10.1038/38444>
2. Ransom M., Dennehey B.K., Tyler J.K. Chaperoning histones during DNA replication and repair // *Cell*. 2010. V. 140, P. 183–195. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.004>
3. Kouzarides T. Chromatin modifications and their function // *Cell*. 2007. V. 128. P. 693–705. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.02.005>
4. Gaillard P.H., Martini E.M., Kaufman P.D. et al. Chromatin assembly coupled to DNA repair: A new role for chromatin assembly factor 1 // *Cell*. 1996. V. 86. P. 887–96. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80164-6](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80164-6)
5. 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. <https://doi.org/10.3390/genes12071083>
6. Becker P.B., Horz W. ATP-dependent nucleosome remodeling // *Annu. Rev. Biochem.* 2002. V. 71. P. 247–273. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.71.110601.135400>
7. Smith C.L., Peterson C.L. ATP-dependent chromatin remodeling // *Curr. Top. Dev. Biol.* 2005. V. 65. P. 115–148. [https://doi.org/10.1016/S0070-2153\(04\)65004-6](https://doi.org/10.1016/S0070-2153(04)65004-6)
8. Shen X., Mizuguchi G., Hamiche A., Wu C. A chromatin remodelling complex involved in transcription and DNA processing // *Nature*. 2000. V. 406. P. 541–544. <https://doi.org/10.1038/35020123>
9. Morrison A., Highland J., Krogan N. et al. INO80 and gamma-H2AX interaction links ATP-dependent chromatin remodeling to DNA damage repair //

- Cell. 2004. V. 119. № 6. P. 767–775. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.11.037>
10. Morrison A., Kim J.-A., Person M.D. et al. Mec1/Tel1 phosphorylation of the INO80 chromatin remodeling complex influences DNA damage checkpoint responses // Cell. 2007. V. 130. P. 499–511. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.06.010>
 11. Van Attikum H., Fritsch O., Hohn B., Gasser S.M. Recruitment of the INO80 complex by H2A phosphorylation links ATP-dependent chromatin remodeling with DNA double-strand repair // Cell. 2004. V. 119. P. 777–788. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.11.033>
 12. Tosi A., Haas C., Herzog F. et al. Structure and subunit topology of the INO80 chromatin remodeler and its nucleosome complex // Cell. 2013. V. 154. P. 1207–1219. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.08.016>
 13. Yao W., King D.A., Beckwith S.L. et al. The INO80 complex requires the Arp5-Ies6 subcomplex for chromatin remodeling and metabolic regulation // Mol. Cell Biol. 2016. V. 36. P. 979–991. <https://doi.org/10.1128/MCB.00801-15>
 14. Falbo K., Alabert C., Katou Y. et al. Involvement of a chromatin remodeling complex in damage tolerance during DNA replication // Nat. Struct. Mol. Biol. 2009. V. 16. P. 1167–1172. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1686>
 15. Shen X., Choi E., Wu C. Involvement of actin-related proteins in ATP-dependent chromatin remodeling // Mol. Cell. 2003. V. 12. P. 147–155. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(03\)00264-8](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(03)00264-8)
 16. Ray S., Grove A. The yeast high mobility group protein HMO2 domains of the chromatin-remodeling complex INO80, binds DNA ends // Nucl. Acids Res. 2009. V. 37. P. 6389–6399. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp695>
 17. Ray S., Grove A. Interaction of *Saccharomyces cerevisiae* HMO2 domains with distorted DNA // Biochemistry. 2012. V. 51. P. 1825–1835. <https://doi.org/10.1021/bi201700h>
 18. Fillingham J., Recht J., Silva A.C. et al. Chaperone control of the activity and specificity of the histone H3 acetyltransferase RTT109 // Mol. Cell Biol. 2008. V. 28. P. 4342–4353. <https://doi.org/10.1128/MCB.00182-08>
 19. Campos E.I., Fillingham J., Li J. et al. The program for processing newly synthesized histones H3.1 and H4 // Nat. Struct. Mol. Biol. 2010. V. 17. P. 1343–1351. PubMed ID: 20953179
 20. Barman H.K., Takami Y., Nashijima H. et al. Histone acetyltransferase-1 regulates integrity of cytosolic histone H3-H4 containing complex // Biophys. Res. Commun. 2008. V. 373. P. 624–630. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.05.079>
 21. Jasencakova Z., Scharf A.N., Corpet A. et al. Replication stress interferes with histone recycling and predeposition marking of new histones // Mol. Cell. 2010. V. 37. P. 736–743. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.01.033>
 22. Ai X., Parthun M.R. The nuclear Hat1p/Hat2p complex: A molecular link between type B histone acetyltransferases and chromatin assembly // Mol. Cell. 2004. V. 14. P. 195–205. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(04\)00184-4](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(04)00184-4)
 23. Poveda A., Pamblanco M., Tafrov S. et al. Hif1 is a component of yeast histone acetyltransferase B, a complex mainly localized in the nucleus // J. Biol. Chem. 2004. V. 279. P. 16033–16043. <https://doi.org/10.1074/jbc.M314228200>
 24. Verreault A., Kaufman P.D., Kobayashi R., Stillman B. Nucleosomal DNA regulates the core-histone-binding subunit of the human Hat1 acetyltransferase // Curr. Biol. 1998. V. 8. P. 96–108. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(98\)70040-5](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(98)70040-5)
 25. Suganuma T., Pattenden S.G., Workman J.L. Diverse functions of WD40 repeat proteins in histone recognition // Genes Dev. 2008. V. 22. P. 1265–1268. <https://doi.org/10.1101/gad.1676208>
 26. Song J.J., Garlick J.D., Kingston R.E. Structural basis of histone H4 recognition by p53 // Genes Dev. 2008. V. 22. P. 1313–1318. <https://doi.org/10.1101/gad.1653308>
 27. Furuyama T., Dalal Y., Henikoff S. Chaperone-mediated assembly of centromeric chromatin in vitro // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2006. V. 103. P. 6172–6177. <https://doi.org/10.1073/pnas.0601686103>
 28. Gavin A.C., M. Bösch M., Krause R. et al. Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes // Nature. 2002. V. 415. P. 141–147. <https://doi.org/10.1038/415141a>
 29. Blackwell J.S., Wilkinson S.T., Mosammaparast N., Pemberton L.F. Mutational analysis of H3 and H4 N termini reveals distinct roles in nuclear import // J. Biol. Chem. 2007. V. 282. P. 20142–20150. <https://doi.org/10.1074/jbc.M701989200>
 30. 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>
 31. Захаров И.А., Кожин С.А., Кожина Т.А. и др. Сборник методик по генетике дрожжей-сахаромицетов. Л.: Наука, 1984. изд. 2-е. 144 с.
 32. Ковальцова С.В., Королев В.Г. Штамм дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* для тестирования мутагенов окружающей среды на основе взаимодействия мутаций *rad2* и *him1* // Генетика. 1996. Т. 32. № 3. С. 366–372.
 33. 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. 65–75.

34. *Lea C.A., Coulson D.E.* The distribution of the number of mutants in bacterial populations // *J. Genet.* 1949. V. 49. P. 264–285. <https://doi.org/10.1007/BF02986080>
35. *Khromov-Borisov N.N., Saffi J., Henriques J.A.P.* Perfect order plating: principal and applications // *TTO1*. 2002.TO2638
36. *De Koning L., Corpet A., Haber J.E., Almouzni G.* Histone chaperones: An escort network regulating histone traffic // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2007. V. 14. P. 997–1007. <https://doi.org/10.1038/nsmb1318>
37. *Burgess R.J., Zhang Z.* Histone chaperones in nucleosome assembly and human disease // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2013. V. 20. P. 14–22. <https://doi.org/10.1038/nsmb2461>
38. *Chai B., Huang J., Cairns B., Laurent B.* Distinct roles for the RSC and Swi/Snf ATP-dependent chromatin remodelers in DNA double-strand break repair // *Genes Dev.* 2005. V. 19. P. 1656–1661. <https://doi.org/10.1101/gad.1273105>
39. *Shim E., Ma J., Oum J. et al.* The yeast chromatin remodeler RSC complex facilitates end joining repair of DNA double-strand breaks // *Mol. Cell. Biol.* 2005. V. 25. P. 3934–3944. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.10.3934-3944.2005>
40. *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>
41. *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. <https://doi.org/10.3390/genes14061242>
42. *Chambers A.L., Ormerod G., Durley S.C. et al.* The INO80 chromatin remodeling complex prevents polyploidy and maintains normal chromatin structure at centromeres // *Genes Dev.* 2012. V. 26. P. 2590–2603. <https://doi.org/10.1101/gad.199976.112>
43. *Carrozza M.J., Li B., Florens L. et al.* Histone H3 methylation by Set2 directs deacetylation of coding regions by Rpd3S to suppress spurious intragenic transcription // *Cell*. 2005. V. 123. P. 581–592. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.10.023>
44. *Keogh M.C., Kurdastani S.K., Morris S.A. et al.* Cotranscriptional set2 methylation of histone H3 lysine 36 recruits a repressive Rpd3 complex // *Cell*. 2005. V. 123. P. 593–605. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.10.025>
45. *Chen X.-F., Kuryan B., Kitada T. et al.* The Rpd3 core complex is a chromatin stabilization module // *Curr. Biol.* 2012. V. 22. P. 56–63. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2011.11.042>
46. *Kelberg E.P., Kovaltsova S.V., Alekseev S.Yu. et al.* *HIM1*, a new yeast *Saccharomyces cerevisiae* gene playing a role in control of spontaneous and induction mutagenesis // *Mutat. Res.* 2005. V. 578. P. 64–78. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2005.03.003>
47. *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>
48. *Евстюхина Т.А., Алексеева Е.А., Федоров Д.В. и др.* Роль ремодулирующих комплексов CHD1 и ISWI в контроле спонтанного и УФ-индуцированного мутагенеза у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* // *Генетика*. 2017. Т. 53. № 2. С. 173–180.
49. *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>

The Role of Different Subunits of INO80 Remodeling Complex in Repair Chromatin Assembly in Yeast *Saccharomyces cerevisiae*

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

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

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

Reparative chromatin assembly is an important step in maintaining genome stability. The correct assembly of chromatin is provided by histone chaperones, whose dysfunction can lead to the development of various forms of cancer and a number of hereditary diseases in humans. The effect of remodeling factors completes chromatin repair. The yeast chromatin remodeling complex INO80 plays an important role in chromatin architecture. We used induced mutagenesis and real-time PCR to study the role of INO80 in chromatin repair assembly. In double mutants *ies5Δ hsm3Δ(hif1Δ)*, defects in the structure of nucleosomes caused by mutations *hsm3Δ* and *hif1Δ* lead to hypersensitivity of cells to UV radiation and the disappearance of *hsm3*- and *hif1*-specific mutagenesis. Double mutants carrying the *nhp10Δ* mutation and *hsm3Δ* or *hif1Δ* mutations were indistinguishable from a single mutant in terms of the lethal effect of UV irradiation, however, the high UV-induced mutagenesis characteristic of all mutations disappeared. Thus, we found that mutations in the genes controlling the subunits of the INO80 complex can exhibit strong interactions with mutations in histone chaperone genes. We have confirmed the hypothesis that the Him1 protein performs a chaperone function in the process of reparative chromatin assembly.

Keywords: INO80 complex, *S. cerevisiae*, *IES5* gene, *NHP10* gene, UV-induced mutagenesis.