

РЕПАРАТИВНАЯ ДНК-ПОЛИМЕРАЗА *eta* (Polη)
ИГРАЕТ КЛЮЧЕВУЮ РОЛЬ В МУТАГЕНЕЗЕ ПРИ НИЗКИХ ДОЗАХ
УФ-ОБЛУЧЕНИЯ У ДРОЖЖЕЙ *Saccharomyces cerevisiae*

© 2024 г. Е. А. Алексеева^{1, 2, *}, Т. А. Евстюхина^{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@pnpi.nrcki.ru

Поступила в редакцию: 20.05.2024 г.

После доработки: 12.07.2024 г.

Принята к публикации: 16.07.2024 г.

В нормальных условиях и при воздействии малых доз мутагенов ключевым способом борьбы с повреждениями ДНК у бактериальных и эукариотических клеток является система толерантности к повреждениям ДНК (ТПД). Две различные ветви ТПД, ошибочная (translesion synthesis – TLS) и безошибочная (рекомбинационная), функционируют во всех эукариотических организмах. TLS вовлекает белковый комплекс полимеразы дзета (Polζ) (кодируемый генами *REV1*, *REV3* и *REV7*) и полимеразу эта (Polη) (кодируемую геном *RAD30*); эти полимеразы эволюционно консервативны от дрожжей до человека. Мы показали, что при низких уровнях доз УФ-излучения решающую роль в мутагенезе играет высокая активность Polη, которая обходит подавляющее число оказавшихся на пути репликативной машины повреждений ДНК. Как в случае облучения высокими, так и низкими дозами УФ-лучей большую роль в индуцированном мутагенезе играет чекпойнт. Однако функции генов, участвующих в регуляции УФ-индуцированного мутагенеза при низких и высоких дозах, часто различаются. Инактивация гена *RAD30* при низких дозах приводит к повышенному уровню индуцированного мутагенеза, а при высоких дозах мутагенез практически не отличается от уровня штамма дикого типа. Делекции генов *HIM1*, *HSM3* и *HIFI*, наоборот, снижают высокий уровень мутагенеза, характерный для высоких доз, до уровня штамма дикого типа при низких дозах. Эти различия, по-видимому, характеризуют локальный и глобальный чекпойнт.

Ключевые слова: Polη, *S. cerevisiae*, чекпойнт, низкие дозы, УФ-индуцированный мутагенез.

DOI: 10.31857/S0016675824120035 **EDN:** WAUMSD

Клетка в ответ на повреждения ДНК использует сеть сигнальных переносчиков, возникающих при прохождении клеточного цикла (чекпойнт) и в течение репарационного процесса [1]. Согласно с этими сигналами чекпойнт формирует ответ клетки на повреждения ДНК [2]. Хотя хорошо известно, что чекпойнт имеет решающее значение для поддержания целостности генома, но как клетка балансирует между остановкой клеточного цикла и клеточной пролиферацией в условиях постоянных эндогенных и экзогенных источников повреждения ДНК остается загадкой. Например, для устранения небольших количеств повреждений ДНК (таких как спонтанные повреждения оснований) используются эксцизионная репарация и процесс толерантности к повреждениям ДНК. При этом

существенной задержки клеточного цикла не происходит. Однако при ответе на более высокие уровни повреждений ДНК эти процессы становятся тесно интегрированными с задержкой клеточного цикла (глобальный чекпойнт) [1]. Для генотоксических агентов существует порог дозы, ниже которого активация чекпойнта минимальна, несмотря на низкую активность путей репарации ДНК. Этот порог может варьировать в зависимости от повреждающего агента, организма и типа клеток.

Доминирующую роль в толерантности к повреждениям ДНК играет безошибочная ветвь постреплиативной репарации (ПРР), которую часто называют рекомбинационной, так как оба типа репарации имеют общую стадию образования D-петли. Наибольший прогресс в изучении связи между

мутагенезом, репарацией, динамикой хроматина и клеточным циклом достигнут на модельном одноклеточном эукариотическом организме – почкующихся дрожжах *Saccharomyces cerevisiae*. Эксперименты с дрожжами показали, что безошибочные механизмы являются основными путями ПРР при любых репликативных стрессах [2–6]. Тем не менее в литературе есть примеры, когда ошибочный путь синтеза через повреждение (TLS) при малых количествах повреждений ДНК может быть также эффективным [1].

В дрожжах во время нормальной репликации ДНК канонический путь глобального чекпойнта, регулируемого киназами Mec1 и Rad53, не функционирует. Перед вступлением в S-фазу клетки не накапливают больших количеств дНТФ, а скорее входят в нее с субоптимальными уровнями дНТФ [7]. Невысокий уровень дезоксинуклеотидов при входе в S-фазу быстро истощается. При этом ДНК-полимеразы, вероятно, не способны эффективно использовать дНТФ в таких низких концентрациях и должны останавливаться и активировать путь, контролируемый Mec1 – Rad53. Активация синтеза дНТФ происходит в ответ на накопление многочисленных однонитевых брешей за остановленными вилками репликации. Временная активация Mec1-зависимого пути приводит к деградации репрессора Sml1 и активации экспрессии генов, кодирующих субъединицы комплекса рибонуклеотидредуктазы (RNR), и, как следствие, синтезу необходимых количеств дНТФ.

Таблица 1. Штаммы дрожжей, использованные в работе

Штамм	Генотип
LMG-3031	<i>MATα ade2Δ-248 ura3-160, 188 leu2-3, 112 trp1</i>
4-EAA-3031	<i>MATα ade2Δ-248 ura3-160, 188 leu2-3, 112 trp1 rad30Δ</i>
TAE-152	<i>MATα ade2Δ-248 ura3-160, 188 leu2-3, 112 trp1 rad30Δ hsm3Δ</i>
TAE-141	<i>MATα ade2Δ-248 ura3-160, 188 leu2-3, 112 trp1 rad30Δ rad53+HA-F</i>
TAE-142	<i>MATα ade2Δ-248 ura3-160, 188 leu2-3, 112 trp1 rad30Δ sml1Δ</i>
TAE-140	<i>MATα ade2Δ-248 ura3-160, 188 leu2-3, 112 trp1 rad30Δ pms1Δ</i>
5-EAA-3031	<i>MATα ade2Δ-248 ura3-160, 188 leu2-3, 112 trp1 rad30Δ him1Δ</i>
6-DVF-3031	<i>MATα ade2Δ-248 ura3-160, 188 leu2-3, 112 trp1 sml1Δ</i>
1-EAA-3031	<i>MATα ade2Δ-248 ura3-160, 188 leu2-3, 112 trp1 him1Δ</i>
10-DVF-3031	<i>MATα ade2Δ-248 ura3-160, 188 leu2-3, 112 trp1 rad53+HA-F</i>
9-DVF-3031	<i>MATα ade2Δ-248 ura3-160, 188 leu2-3, 112 trp1 rad53+HA-F him1Δ</i>
CAY-3	<i>MATα ade2Δ-248 ura3-160, 188 leu2-3, 112 trp1 hif1Δ</i>
5-LMG-3031	<i>MATα ade2Δ-248 ura3-160, 188 leu2-3, 112 trp1 hsm3Δ</i>
TAE-143	<i>MATα ade2Δ-248 ura3-160, 188 leu2-3, 112 trp1 hif1Δ rad30Δ</i>
2-IVF-312	<i>MATα ade2Δ-248 ura3-160, 188 leu2-3, 112 trp1 pms1Δ</i>

Изучение молекулярного механизма биологического действия сверхмалых количеств повреждений ДНК является актуальной задачей. Из литературы известно, что только мутанты с нарушением путей пострепликативной репарации проявляли какую-либо чувствительность к хроническому воздействию низких доз УФ-излучения [4, 8]. В настоящей работе мы показали, что при низких уровнях доз УФ-излучения решающую роль в мутагенезе играет высокая активность Pol η , которая обходит подавляющее число повреждений ДНК, оказавшихся на пути репликативной машины. При этом частота УФ-индуцированного мутагенеза у мутанта *rad30Δ* зависит от уровня активации комплекса RNR. В отсутствие Pol η ее роль в пострепликативной репарации выполняет склонная к ошибкам Pol ζ , которая создает ошибки в сайте повреждения и на неповрежденной нити в процессе репаративного синтеза ДНК.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Штаммы

Делекции генов получали путем ПЦР-опосредованного разрушения генов [9] с использованием специфических маркеров. Генотипы штаммов дрожжей, использованных в настоящем исследовании, представлены в табл. 1.

Получение штаммов

ПЦР-генерированный *KanMX* модуль был амплифицирован из плазиды pFLA6A-*kanMX*6, полученной от В.Ф. Латыпова, с использованием праймеров: *RAD30* DelL: 5'-ACTTGGAAAGGAGTT GATTAGCTGGTCCCCAGTAAAGCATACGA GTCCTCCTAGCATGTATGCCCGCTCGTACG CTGCAGGTG-3';

RAD30 DelR: 5'-CTTGTAAAAATGATAAGATG TTTTGGAAAGATGTAACCTGTTCTGAGGT GTGGCAGTATGTTGTGGCATAGGCCACTAGTG GATC-3'.

10-DVF-3031, 6-DVF-3031, CAY-3 и 2-IVF-312 трансформировали фрагментом ДНК, содержащим маркер *KanMX*, с фланкирующими нуклеотидными последовательностями, гомологичными флангам гена *RAD30*. Трансформанты с делецией гена *RAD30* отбирали по их устойчивости к канамицину (G418) с использованием полной среды, содержащей G418 в концентрации 200 мкг/мл. Разрушение гена *RAD30* было подтверждено с помощью ПЦР. Таким образом получены двойные мутанты: TAE-141, TAE-142, TAE-143 и TAE-140 (табл. 1).

Питательные среды

Состав полной среды YPD для выращивания культур и учета выживаемости приведен в [9]. В качестве селективной среды для учета частоты УФ-индуцированных мутаций устойчивости к канаванину использовали минимальную среду, обогащенную полным набором аминокислот (за исключением аргинина) и азотистых оснований [10]. 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 жидкой YPD при 30 °C. Клетки промывали и ресуспенсировали в воде с плотностью 1×10^7 клеток/мл. Суспензию клеток облучали УФ-лампой БУВ-30 (диапазон УФ-С) с мощностью дозы на верхнем уровне 1.4 Дж / м² × с. Аликвоты отбирали после различных доз облучения, разбавляли и помещали на чашки с YPD для определения количества выживших.

Мутационный тест

Мутационные тесты проводили путем выращивания в течение ночи клеток соответствующего штамма в жидкой YPD при 30 °C. Клетки промывали и ресуспенсировали в воде с плотностью 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.

Для определения частоты мутаций неразведенные аликвоты высевали на среду с канаванином.

ПЦР в реальном времени

Для проведения ПЦР в реальном времени была использована система детекции RT-PCR CFX96 (Bio-Rad, Великобритания). Реакции проводили в объеме 25 мкл, состоящем 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 5'-ACACCTTCATGGTTATAAG-3' и Rev 5'-CGACGATTTCACAAACATAA-3'; для гена *ACT1*: For 5'-GAAGGTCAAGATCATTGC-3 и Rev 5'-GTTGGAAGGTAGTCAAAG-3').

Условия амплификации ПЦР были следующими: 1 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 по крайней мере по трем повторностям со стандартной ошибкой среднего (SEM), а статистические различия определялись с помощью *t*-критерия Стьюдента. Значимость определяли на уровне $p < 0,05$ [11].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Как отмечалось выше, путь TLS может эффективно использоваться при низких уровнях повреждений ДНК. Это подтверждается данными работы [12], из которой видно, что мутация *rad30Δ* десятикратно повышает репаративный спонтанный мутагенез. Одним из основных участников TLS-пути является Polη, кодируемая геном *RAD30*. На неповрежденной матрице Polη создает мутации со скоростью $10^{-2} - 10^{-3}$, в то же время она способна обходить УФ-индуцированные *cis*-син циклобутановые димеры с высокой точностью [13–15]. Уровень УФ-индуцированного мутагенеза у мутанта *rad30Δ* зависит в значительной степени от дозы облучения. При высоких уровнях УФ-доз (выше 40 Дж/м²) выживаемость мутанта *rad30Δ* практически не отличалась от выживаемости штамма дикого типа, частота индуцированного мутагенеза также не отличалась или даже была ниже, чем у клеток

дикого типа [12]. При снижении дозы уровень мутагенеза начинает превышать уровень дикого типа [16].

УФ-индуцированный мутагенез у мутанта *rad30Δ* при низких дозах облучения

Показано, что УФ-облучение клеток дрожжей, находящихся в различных стадиях клеточного цикла, влияет на количество молекул Pol η в большей степени, когда клетки облучались в начале S-фазы, чем в G₁- или в G₂-фазе. В S-фазе отмечены два противоположных эффекта. С одной стороны, с увеличением дозы УФ в начале этой фазы значительно задерживалось движение по циклу, как результат, происходило накопление Pol η . С другой стороны, степень накопления полимеразы была обратно пропорциональна дозе УФ-лучей, так что при дозе 10 Дж/m² концентрация Pol η была значительно больше, чем при 80 Дж/m² [17]. Возникает вопрос, зачем клетки после УФ-облучения накапливают большое количество полимеразы Pol η в самом начале S-фазы? Для разрешения этого вопроса мы изучили УФ-индуцированный мутагенез у мутанта *rad30Δ* при низких дозах облучения в сравнении с клетками дикого типа. Мутант *rad30Δ* показал высокую чувствительность к мутагенному действию низких доз УФ-излучения. При дозе 7 Дж/m² частота мутагенеза у мутанта *rad30Δ* была примерно в 3 раза выше, чем у клеток штамма дикого типа (рис. 1). Таким образом, можно предположить, что высокая концентрация Pol η в начале S-фазы необходима для эффективного и точного обхода относительно небольшого числа повреждений ДНК, которые остаются после репарационного процесса и попадают в вилки репликации, что может обеспечить нормальную скорость репликативного процесса.

В клетках мутанта *rad30Δ TLS* происходит при участии Pol ζ [16]. Отсюда следует, что причиной *rad30Δ*-опосредованного УФ-индуцированного мутагенеза является замена Pol δ на ошибочную Pol ζ при синтезе ДНК в репаративных брешах. Эта полимераза обладает высокой процессивностью и способна заполнить репаративную брешь. При этом она будет создавать мутации в сайте повреждения и из-за отсутствия у нее редакторской функции делать ошибки при репаративном синтезе неповрежденной ДНК. Последние являются субстратом для репарации ошибочно спаренных оснований (мисматч-репарация). Чтобы проверить это предположение, мы удалили ген *PMS1*, который является одним из ключевых участников мисматч-репарации, у мутанта *rad30Δ*. Одиночный мутант *rad30Δ* при низких уровнях доз УФ-излучения показал значимую чувствительность, в то время как одиночный *pms1Δ* не отличался от штамма дикого типа (рис. 1). Двойной мутант *pms1Δ rad30Δ* не отличался по этому показателю от штамма дикого типа и

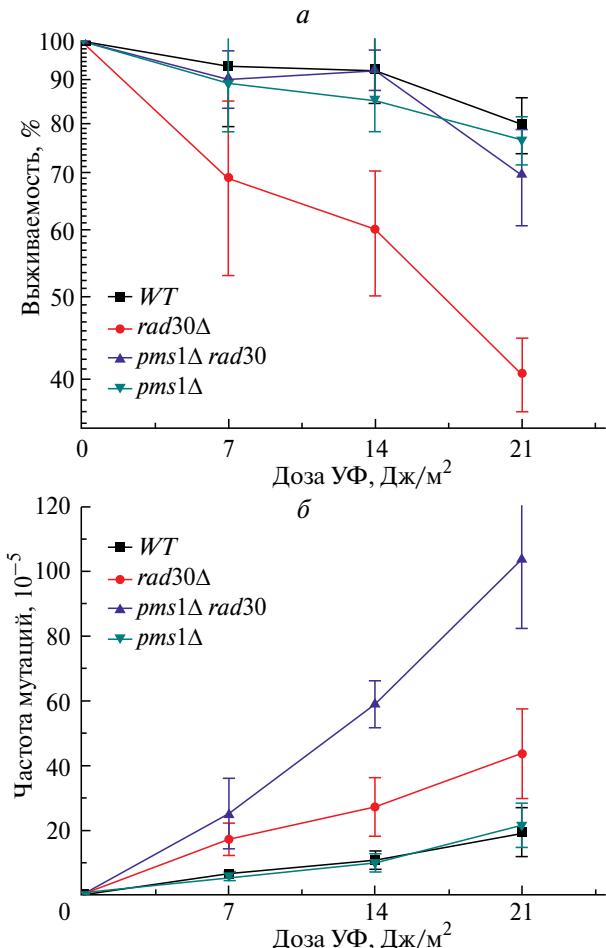


Рис. 1. Чувствительность к УФ-свету и частота УФ-индуцированного мутагенеза в локусе *CAN1* у штамма дикого типа и мутантных штаммов *rad30Δ*, *pms1Δ* и *pms1Δ rad30Δ* при обработке дозами 7, 14 и 21 Дж/m² ультрафиолетового излучения. На графиках показаны стандартные ошибки среднего значения (\pm SEM), полученные в результате пяти независимых экспериментов.

одиночного *pms1Δ*. Этот результат показывает, что УФ-чувствительность одиночного мутанта *rad30Δ* связана с работой мисматч-репарации. В двойном мутанте *pms1Δ rad30Δ* уровень индуцированного мутагенеза при низких дозах УФ был в 2 раза выше, чем у одиночного мутанта *rad30Δ* (рис. 1). На основании полученных результатов можно сделать вывод, что в отсутствие Pol η в клетках дрожжей ее роль в пострепликативной репарации выполняет ошибочная Pol ζ , которая создает мутации в сайте повреждения и на неповрежденной нити в процессе репаративного синтеза ДНК. Репаративный синтез может происходить, когда Pol ζ обходит повреждение и продолжает синтез до заполнения бреши. При этом процесс обхода повреждения будет осуществлен без участия рекомбинационной ветви пострепликативной репарации. Второй путь обхода

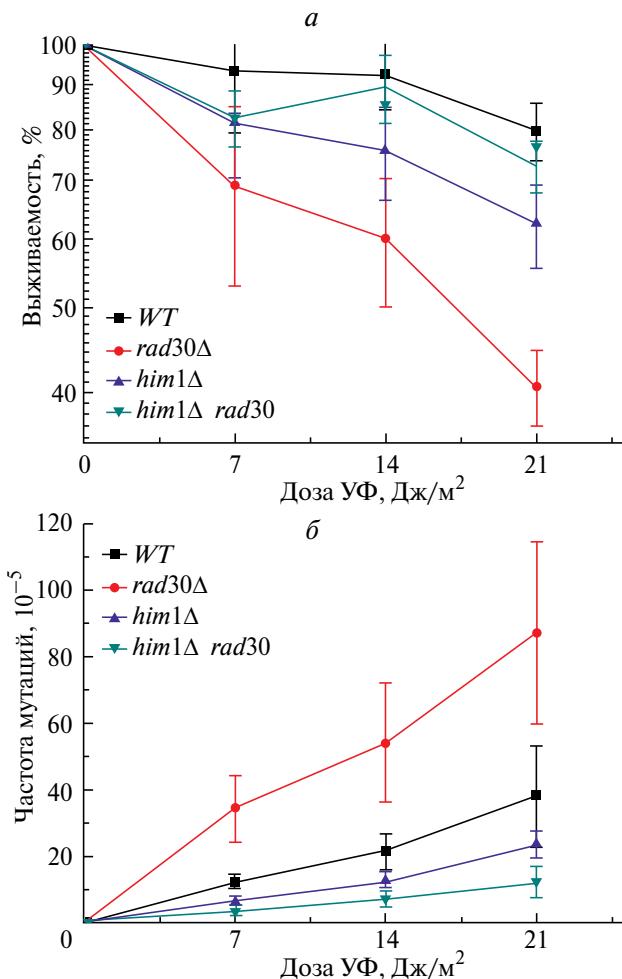


Рис. 2. Чувствительность к УФ-свету и частота УФ-индуцированного мутагенеза в локусе *CAN1* у штамма дикого типа и мутантных штаммов *rad30Δ*, *him1Δ* и *him1Δ rad30Δ* при обработке дозами 7, 14 и 21 Дж/м² ультрафиолетового излучения. На графиках показаны стандартные ошибки среднего значения (\pm SEM), полученные в результате пяти независимых экспериментов.

повреждения по механизму безошибочной ветви пострепликативной репарации может осуществляться при участии $\text{Pol}\zeta$ для заполнения участка бреши, образовавшегося при преждевременной терминации D-петли [11].

УФ-индуцированный мутагенез у мутанта *him1Δ* при низких дозах облучения

Ранее мы показывали, что гены, контролирующие репаративную сборку хроматина, задействованы в контроле локального чекпойнта через подавление экспрессии генов комплекса RNR [11, 18]. В связи с этим мы провели эпистатический анализ взаимодействия мутации *rad30Δ* с мутациями в генах, контролирующих репаративную сборку хроматина. Предполагается, что белок Him1 в клетках

дрожжей выполняет функцию гистонового шаперона при репаративной сборке хроматина [18]. Мутация *him1Δ* имеет фенотип, подобный мутации *hsm3Δ*, но супрессирует УФ-индуцированную активность рибонуклеотидредуктазного комплекса RNR более эффективно, чем *hsm3Δ* [19]. Одиночный мутант *him1Δ* показал слабую чувствительность к летальному действию УФ по сравнению со штаммом дикого типа (рис. 2), как и при высоких дозах.

Однако уровень индуцированного мутагенеза при всех использованных дозах у мутанта *him1Δ* был ниже, чем у штамма дикого типа, что кардинально отличается от этого показателя при высоких дозах УФ-излучения [19]. Этот результат можно объяснить тем, что у одиночного мутанта *him1Δ* после работы $\text{Pol}\zeta$ остается мало повреждений ДНК, что снижает до минимума активацию киназы Rad53. При этом будет понижена роль рекомбинационной ветви репарации и, как следствие, понижен *him1Δ*-специфический мутагенез. У двойного мутанта *him1Δ rad30Δ* при низких дозах УФ мутация *him1Δ* подавляла чувствительность мутанта *rad30Δ* так, что двойной мутант не отличался по выживаемости от штамма дикого типа (рис. 2). В отношении УФ-индуцированного мутагенеза двойной мутант характеризовался слабо выраженным понижением уровня частоты мутагенеза, по сравнению с одиночным мутантом *him1Δ* и полной супрессией *rad30Δ*-специфического мутагенеза (рис. 2). Понижение частоты мутагенеза в двойном мутанте по сравнению с одиночным мутантом происходит вследствие увеличения количества выживших клеток при одинаковой дозе у двойного мутанта. Для подтверждения этого предположения мы провели эксперимент по измерению экспрессии гена *RNR3* при низкой дозе УФ-лучей в мутанте *him1Δ* и штамме дикого типа. Из рис. 3 видно, что уровень экспрессии в обоих штаммах практически не отличался, что подтверждает наше предположение.

Суммируя полученные результаты, можно заключить, что мутация *him1Δ* супрессирует УФ-чувствительность и резко подавляет УФ-индуцированный мутагенез мутанта *rad30Δ*. Таким образом, частота УФ-индуцированного мутагенеза у мутанта *rad30Δ* зависит от уровня активации комплекса RNR.

УФ-индуцированный мутагенез у мутантов по генам комплекса NuB4 при низких дозах УФ-излучения

Мутации *hsm3Δ* и *hif1Δ* инактивируют обе субъединицы ацетилазного комплекса NuB4, выполняющего функцию гистонового шаперона при репаративной сборке хроматина, и частично супрессируют УФ-индуцированную активность RNR. Белки, кодируемые этими генами, как и

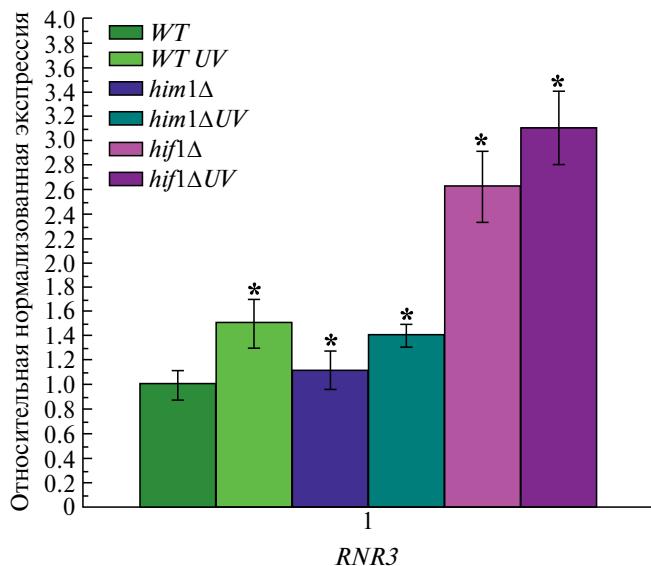


Рис. 3. Относительная нормализованная экспрессия гена *RNR3* в штамме дикого типа и мутантных штаммах *him1Δ* и *hif1Δ* до и после облучения их ультрафиолетовым светом (после УФ-облучения клетки выдерживали в течение четырех часов при 30 °C в термостате для индукции), доза УФ-излучения составляла 14 Дж/м²; * $p < 0,05$, *t*-критерий Стьюдента.

белок Him1, функционируют в контроле рекомбинационной ветви постстрепликативной репарации [12, 18]. На рис. 4 приведены кривые зависимости выживаемости от дозы УФ-лучей для одиночных *hsm3Δ*, *rad30Δ* и двойного *hsm3Δ rad30Δ* мутантов.

На рис. 4 можно видеть, что мутация *hsm3Δ*, возможно, имеет слабый супрессорный эффект на выживаемость мутанта *rad30Δ*. Мутация *hsm3Δ* при низких дозах УФ не влияет на мутагенез и полностью подавляет *rad30Δ*-специфический мутагенез. Как и в случае с мутантом *him1Δ*, в одиночном мутанте *hsm3Δ* после работы Polη будет снижена активация киназы Rad53, но в меньшей степени, чем у мутанта *him1Δ*. При этом мутация *hsm3Δ* супрессирует *rad30Δ*-специфический мутагенез до уровня штамма дикого типа.

Одиночный мутант *hif1Δ* при низких дозах УФ оказался немного чувствительнее штамма дикого типа и более устойчивым, чем мутант *rad30Δ* (рис. 4). У двойного мутанта мутация *hif1Δ* эпистатировала к мутации *rad30Δ*. Одиночный мутант *hif1Δ* показал уровень УФ-индуцированного мутагенеза, сравнимый с уровнем дикого типа. Уровень УФ-мутагенеза в штамме *hif1Δ rad30Δ* значительно не отличается от одиночного мутанта *rad30Δ* и значительно превышает уровень мутагенеза в штамме дикого типа. Это свидетельствует о том, что мутация *hif1Δ* в меньшей степени, чем *hsm3Δ*, супрессирует активность киназы Rad53, что подтверждается данными измерения экспрессии гена *RNR3* в одиночном мутанте *hif1Δ* (рис. 3). В то же

время при высоких дозах УФ-облучения, когда глобальный чекпойнт полностью активирован, уровень УФ-индуцированного мутагенеза у мутантов *him1Δ*, *hsm3Δ* и *hif1Δ* более выраженно превышает уровень штамма дикого типа [12]. Эти результаты подтверждают высказанное выше заключение, что частота УФ-индуцированного мутагенеза в мутанте *rad30Δ* зависит от уровня активации комплекса RNR.

УФ-индуцированный мутагенез у мутантов по генам, отвечающим за путь дНТФ в клетке, при низких дозах УФ-излучения

Для проверки этого заключения мы разрушили у мутанта *rad30Δ* ген *SML1*, который кодирует

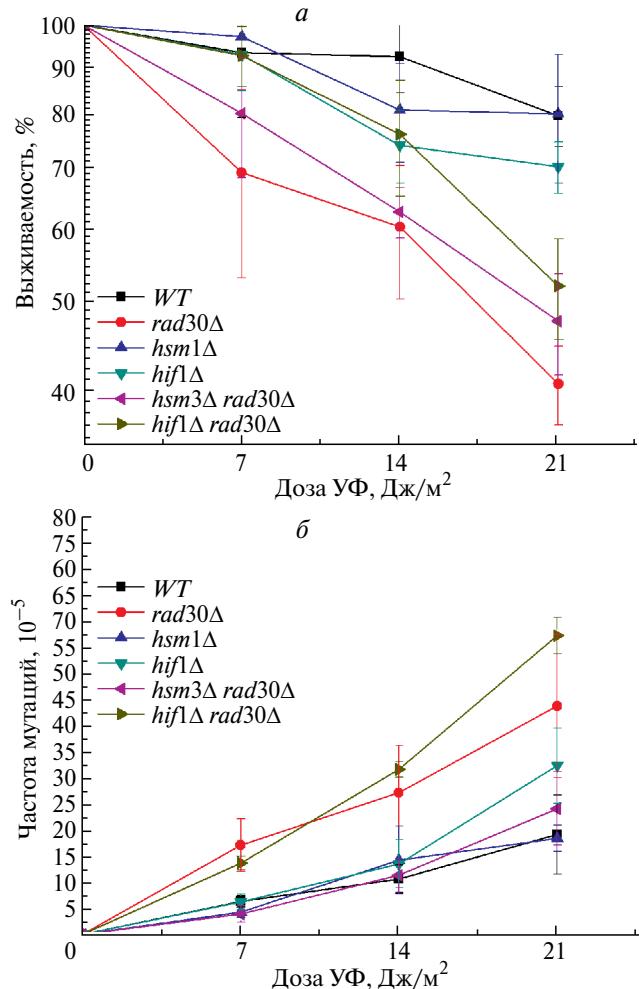


Рис. 4. Чувствительность к УФ-свету и частота УФ-индуцированного мутагенеза в локусе *CAN1* у штамма дикого типа и мутантных штаммов *rad30Δ*, *hsm3Δ*, *hif1Δ*, *hsm3Δ rad30Δ* и *hif1Δ rad30Δ* при обработке дозами 7, 14 и 21 Дж/м² ультрафиолетового излучения. На графиках показаны стандартные ошибки среднего значения (\pm SEM), полученные в результате пяти независимых экспериментов.

супрессор каталитической субъединицы Rnr1 комплекса RNR [20, 21]. Мутация *sml1Δ* увеличивает в клетке пул дНТФ в 2–2.5 раза. Одиночный мутант *sml1Δ* не отличался от штамма дикого типа ни по УФ-чувствительности, ни по уровню УФ-индукции мутагенеза (рис. 5). В двойном мутанте мутация *sml1Δ* супрессировала УФ-чувствительность и *rad30Δ*-специфический мутагенез до уровня штамма дикого типа.

Мутация *rad53 + HA-F* блокирует увеличение экспрессии гена *RNR3*, кодирующего субъединицу комплекса RNR при нормальных условиях роста и после облучения высокими дозами УФ-лучей [12]. Мы использовали эту мутацию для подтверждения высказанного выше утверждения о зависимости частоты УФ-индукции мутагенеза

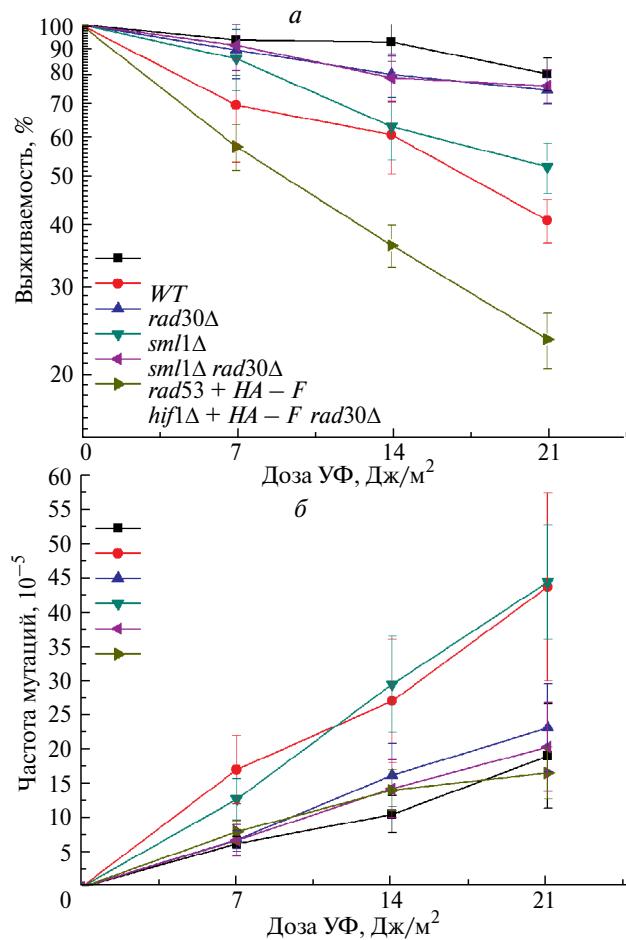


Рис. 5. Чувствительность к УФ-свету и частота УФ-индукции мутагенеза в локусе *CAN1* у штамма дикого типа и мутантных штаммов *rad30Δ*, *sml1Δ*, *rad53 + HA-F*, *sml1Δ rad30Δ* и *rad53 + HA-F rad30Δ* при обработке дозами 7, 14 и 21 $\text{Дж}/\text{м}^2$ ультрафиолетового излучения. На графиках показаны стандартные ошибки среднего значения ($\pm \text{SEM}$), полученные в результате пяти независимых экспериментов.

у мутанта *rad30Δ* от степени активации комплекса RNR. Был сконструирован двойной мутант *rad30Δ rad53 + HA-F* и изучена эффективность низких доз УФ в индукции мутагенеза у двойного мутанта. На рис. 5 представлен полученный результат, из которого следует, что мутация *rad53 + HA-F* эпистатирует к мутации *rad30Δ*, снижая уровень мутагенеза у двойного мутанта до уровня одиночного мутанта *rad53 + HA-F*. Этот результат согласуется с высказанным выше выводом о том, что частота УФ-индукции мутагенеза у мутанта *rad30Δ* зависит от уровня активации экспрессии генов комплекса RNR, которая, в свою очередь, зависит от активности киназы Rad53.

Ген *HAT1* кодирует каталитическую субъединицу комплекса NuB4. Мутация *hat1Δ* инактивирует функцию NuB4, но в отличие от вспомогательных субъединиц практически не влияет на частоту УФ-индукции мутагенеза при высоких дозах облучения и приводит к гиперактивации генов комплекса RNR даже в нормальных условиях роста [11].

При низких дозах УФ-облучения зависимость частоты мутаций от дозы была такая же, как при высоких уровнях доз (рис. 6). Этот результат неудивителен, так как гиперактивация генов комплекса RNR ограничивает уровень УФ-индукции мутагенеза. Суммируя полученные данные, можно заключить, что при низких и высоких дозах УФ-лучей дозовая зависимость мутагенеза у изученных мутантов по генам, контролирующим репаративную сборку хроматина, контролируется уровнем экспрессии генов комплекса RNR.

ОБСУЖДЕНИЕ

Считается, что Pol η является первым из ферментов, осуществляющих TLS. Она быстро привлекается к остановленным репликативным вилкам и отвечает за безошибочный обход 8-оксогуаниновых повреждений ДНК и УФ-индукционных пиримидиновых димеров [13, 22]. Мотив PIP1 Pol η связывается с убиквитин-конъюгирующим комплексом Rad6–Rad18, необходимым для TLS, что способствует локализации Pol η в очагах повреждения ДНК *in vivo* [23]. Предполагается, что Pol η уже находится в комплексе, когда происходит реакция переноса убиквитина [24]. Эти наблюдения подтверждают модель, в которой Pol η может быть задействована в остановленной вилке репликации, когда комплекс Rad6–Rad18–Pol η связывается с PCNA [25].

Мутация *rad30Δ* приводит к тому, что после УФ-облучения низкими дозами клеток этого мутанта, остановленных на повреждениях вилок репликации остается кратно больше по сравнению с клетками дикого типа. Вследствие этого происходит резкое увеличение количества однонитевой

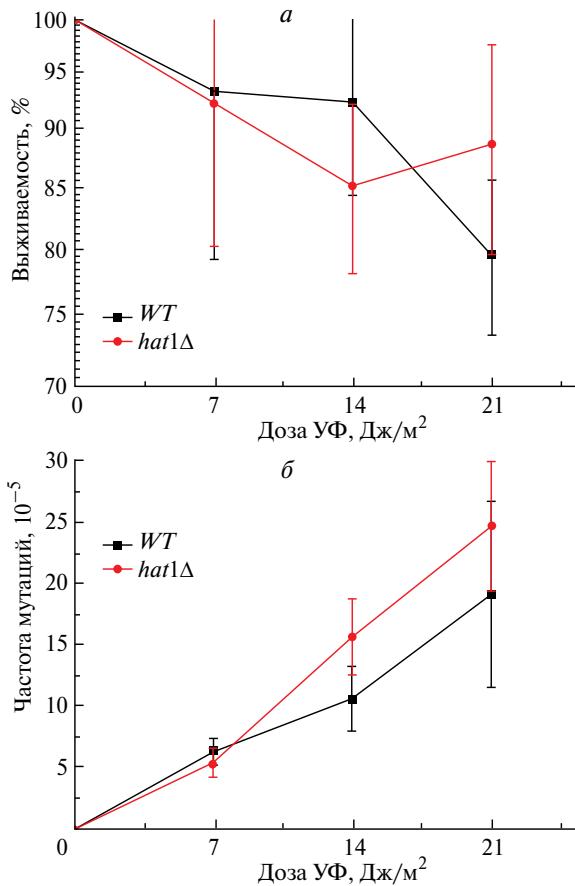


Рис. 6. Чувствительность к УФ-свету и частота УФ-индуцированного мутагенеза в локусе *CAN1* у штамма дикого типа и мутантного штамма *hat1Δ* при обработке дозами 7, 14 и 21 Дж/м² ультрафиолетового излучения. На графиках показаны стандартные ошибки среднего значения (\pm SEM), полученные в результате пяти независимых экспериментов.

ДНК в репарационных брешах. Однонитевая ДНК, покрытая белком Rpa, служит сигналом для активации киназы Rad53. В результате у мутанта *rad30Δ* произойдет избыточная активация киназы и увеличение концентрации дНТФ по сравнению с клетками дикого типа при одинаковой дозе УФ-лучей. Это увеличение и создает предпосылки для *rad30Δ*-специфического мутагенеза. Согласно результатам наших предыдущих работ [11, 18], условия для специфического повышенного мутагенеза возникают, когда активность киназы Rad53 снижается с максимальных значений или повышается с минимальных до промежуточного уровня.

Мутанты дрожжей по генам, кодирующим белки, участвующие в репаративной сборке хроматина, показали высокие уровни спонтанного репаративного мутагенеза, что может свидетельствовать о том, что эти гены могут играть позитивную роль в регуляции локального чекпойнта [12, 18]. Это предположение было подтверждено в экспериментах

по изучению УФ-индуцированного мутагенеза у двойных мутантов *him1Δ rad2Δ*, *hif1Δ rad2Δ*, *hsm3Δ rad2Δ* и *hat1Δ rad2Δ*. Мутанты дрожжей с заблокированной эксцизионной репарацией нуклеотидов очень чувствительны к низким дозам УФ-излучения, которые не индуцируют глобальный чекпойнт. Для всех двойных мутантов мы наблюдали синергическое увеличение частоты индуцированных мутаций, хотя у последнего мутанта это увеличение было в пределах доверительного интервала только при минимальной дозе УФ [11, 12, 26]. Из этих экспериментов следует, что все использованные мутации ответственны за высокий уровень мутагенеза при низких дозах УФ-лучей.

Ранее мы показали, что индуцированный мутагенез у мутанта *rad30Δ* при высоких дозах УФ не отличается от штамма дикого типа, а при очень высоких дозах даже ниже, чем в диком типе [19]. Эти данные противоречили результатам, полученным в работе S. G. Kozmin и соавт. [16], в которой мутант *rad30Δ* показал уровень УФ-индуцированного мутагенеза выше, чем у клеток дикого типа. В настоящей работе мы разрешили это противоречие. Оказалось, что при низких дозах УФ уровень мутагенеза у штамма *rad30Δ* действительно значительно выше по сравнению со штаммом дикого типа (рис. 1). Авторы работы [16] объясняют высокий уровень мутагенеза при низких дозах УФ заменой Pol η на Pol ζ , которая делает частые ошибки на повреждениях, которые в норме безошибочно обходятся Pol η . Однако эксперименты с блокированием мисматч-репарации у мутанта *rad30Δ* ставят под сомнение это утверждение. После обхода повреждения с ошибочным либо безошибочным встраиванием нуклеотидов образуется структура, которая является субстратом для нуклеотид-эксцизионной, но не мисматч-репарации. В то же время мы наблюдаем уровень УФ-индуцированного мутагенеза в двойном мутанте *rad30Δ pms1Δ* в 2 раза выше, чем у одиночного мутанта *rad30Δ* (рис. 1). Этот результат можно объяснить, если субстраты для мисматч-репарации возникают в результате ошибок Pol ζ в ходе репарационного синтеза на неповрежденной матрице. Это предположение вполне допустимо, так как Pol ζ лишена редакторской функции, что снижает точность синтеза ДНК на два порядка по сравнению с репликативными полимеразами. Pol ζ может осуществить репаративный синтез либо сразу после обхода повреждения, либо после преждевременной терминации D-петли в течение рекомбинационного обхода повреждения. Чтобы решить, какой из этих вариантов предпочтительней реализуется в клетке, мы осуществили ряд экспериментов. Если предпочтителен первый вариант, то уровень УФ-мутагенеза не должен заметно зависеть от уровня дНТФ в клетке, в то время как реализация второго варианта требует строго определенного повышения этого уровня

[12]. Мы разрушили ген *SML1* у мутанта *rad30Δ*, что привело к кратному повышению концентрации дНТФ и снижению уровня УФ-мутагенеза до уровня штамма дикого типа (рис. 5). Этот результат свидетельствует в пользу второго варианта. В следующих экспериментах мы, наоборот, ограничили индукцию дНТФ, введя в клетки мутанта *rad30Δ* мутацию *rad53+HA-F* [12]. У мутанта *rad53+HA-F rad30Δ* уровень УФ-индуцированного мутагенеза также снизился до уровня штамма дикого типа (рис. 5). На основании полученных данных мы заключили, что *rad30Δ*-специфический мутагенез реализуется в течение рекомбинационной ветви пострепликативной репарации в результате заполнения репарационной бреши $\text{Pol}\zeta$ после преждевременной терминации *D*-петли, которое требует гипоактивации экспрессии генов комплекса RNR.

Комплекс RNR состоит из четырех субъединиц *Rnr1*, *Rnr2*, *Rnr3* и *Rnr4*, которые кодируются генами *RNR1*, *RNR2*, *RNR3* и *RNR4* соответственно. Из этих генов нас больше всего интересовал *RNR3*, так как его экспрессия увеличивается в ответ на повреждения ДНК, в отличие от других генов данного комплекса, чья экспрессия не изменяется в ответ на повреждения ДНК. Поэтому мы рассматривали экспрессию гена *RNR3* у наших мутантных штаммов как до, так и после облучения их УФ-светом.

Для подтверждения этого заключения мы разрушили у мутанта *rad30Δ* гены *HSM3* и *HIF1*. Ранее мы показали, что делеции генов *HSM3* и *HIF1* приводят к частичному подавлению УФ-индуцированной экспрессии гена *RNR3*, кодирующего одну из катализитических субъединиц комплекса RNR, следствием чего было появление *hsm3Δ*- и *hif1Δ*-зависимого УФ-индуцированного мутагенеза. У двойного мутанта *hsm3Δ hif1Δ* происходило дальнейшее подавление экспрессии *RNR3* и исчезновение повышенного УФ-индуцированного мутагенеза, характерного для одиночных мутантов [11]. Как можно видеть из рис. 4, УФ-индуцированный мутагенез у мутантов *hsm3Δ rad30Δ* и *hif1Δ rad30Δ* был ниже по сравнению с одиночным мутантом *rad30Δ*. Этот результат означает, что *rad30Δ*-специфический мутагенез действительно зависит от уровня экспрессии генов комплекса RNR. К такому же результату приводит разрушение гена *HIM1* у мутанта *rad30Δ* (рис. 2).

При высоких дозах УФ-лучей уровень мутагенеза в одиночных мутантах *him1Δ*, *hsm3Δ* и *hif1Δ* кратно превышал уровень мутагенеза, характерного для штамма дикого типа. Однако при низких дозах УФ мутагенез у одиночных мутантов *hsm3Δ* и *hif1Δ* не имел значимых отличий от штамма дикого типа, а у мутанта *him1Δ* он был даже ниже этого уровня (рис. 2, 4). Это различие можно объяснить тем, что при низких дозах УФ-лучей активная работа нуклеотид-эксцизионной репарации оставляет нерепарированными относительно небольшое

число повреждений, которые успешно обходятся $\text{Pol}\eta$, в результате активация киназы Rad53 низкая, что приводит к низкой экспрессии генов комплекса RNR, а мутации *him1Δ*, *hsm3Δ* и *hif1Δ* дополнительно снижают уровень этой экспрессии.

В отличие от клеток дикого типа у мутанта *rad30Δ* остается значительно больше нерепарированных повреждений, которые будут увеличивать активность киназы Rad53. Эти повреждения будут субстратами пострепликативной репарации в G_2 -фазе клеточного цикла.

Наши результаты показывают, что весь *rad30Δ*-специфический мутагенез происходит на рекомбинационной ветви репарации, так как он зависит от промежуточной активации киназы Rad53. Можно предположить, что $\text{Pol}\delta$ вставляет напротив повреждения случайный нуклеотид и далее происходит перенос вновь синтезированной нити в сестринскую двунитевую ДНК с образованием *D*-петли. На конце внедрившейся нити образуется мисматч, который является субстратом исключительно $\text{Pol}\zeta$, которая продолжит репаративный синтез в *D*-петле и после ее преждевременной терминации на материнской молекуле в бреши. Мисматч-репарация исправит ошибочно спаренные основания, возникшие из-за ошибок $\text{Pol}\zeta$ на неповрежденной матрице, но не затронет ошибку над повреждением.

Суммируя полученные данные, можно сделать вывод, что при низких уровнях доз УФ-излучения решающую роль играет высокая активность $\text{Pol}\eta$, которая обходит подавляющее число оказавшихся на пути репликативной машины повреждений ДНК. Как в случае облучения высокими, так и низкими дозами УФ-лучей большую роль в индуцированном мутагенезе играет чекпойнт. Однако роли генов, участвующих в регуляции УФ-индуцированного мутагенеза, при низких и высоких дозах часто различаются. Например, инактивация гена *RAD30* при низких дозах приводит к повышенному уровню индуцированного мутагенеза, а при высоких дозах практически не отличается от уровня штамма дикого типа. Инактивация генов *HIM1*, *HSM3* и *HIF1*, наоборот, снижает высокий уровень мутагенеза, характерный для высоких доз, до уровня штамма дикого типа при низких дозах. Эти различия характеризуют локальный и глобальный чекпойнт.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта 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. Lazzaro F., Giannattasio M., Puddu F. et al. Checkpoint mechanisms at the intersection between DNA damage and repair // *DNA Repair*. 2009. V. 8. P. 1055–1067. doi: 10.1016/j.dnarep.2009.04.022
2. Prakash L. Characterization of postreplication repair in *Saccharomyces cerevisiae* and effects of *rad6*, *rad18*, *rev3* and *rad52* mutations // *Mol. Gen. Genet.* 1981. V. 184. P. 471–478. doi: 10.1007/BF00352525
3. Baynton K., Bresson-Roy A., Fuchs R.P.P. Analysis of damage tolerance pathways in *Saccharomyces cerevisiae*: A requirement for Rev3 DNA polymerase in translesion synthesis // *Mol. Cell. Biol.* 1998. V. 18. P. 960–966. doi: 10.1128/MCB.18.2.960
4. Hishida T., Kubota Y., Carr A.M., Iwasaki H. RAD6–RAD18–RAD5-pathway-dependent tolerance to chronic low-dose ultraviolet light // *Nature*. 2009. V. 457. P. 612–615. doi: 10.1038/nature07580
5. Huang D., Piening B.D., Paulovich A.G. The preference for error-free postreplication repair in *Saccharomyces cerevisiae* exposed to low-dose methyl methanesulfonate is cell cycle dependent // *Mol. Cell. Biol.* 2013. V. 33. P. 1515–1527. doi: 10.1128/MCB01392-12
6. Zhang H., Lawrence C.W. The error-free component of the RAD6/RAD18 DNA damage tolerance pathway of budding yeast employs sister-strand recombination // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2005. V. 102. P. 15954–15959. doi: 10.1073/pnas.0504586102
7. Forey R., Poveda A., Sharma S. et al. Mec1 is activated at the onset of normal S phase by low-dNTP pools impending DNA replication // *Mol. Cell*. 2020. V. 78. P. 396–410. doi: 10.1016/molcel.2020.02.021
8. Tercero J.A., Longhese M.P., Diffley J.F. A central role for DNA replication forks in checkpoint activation and response // *Mol. Cell*. 2003. V. 11. P. 1323–1336. doi: 10.1016/s1097-2765(03)00169-2
9. 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.
10. 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. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2004.03.003
11. 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. doi: 10.3390/genes12071083
12. 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. doi: 10.3390/genes14061242
13. Johnson R.E., Prakash S., Prakash L. Efficient bypass of a thymine-thymine dimer by yeast DNA polymerase, Polη // *Science*. 1999. V. 283. P. 1001–1004. doi: 10.1126/science.283.5404.1001
14. Prakash S., Johnson R.E., Prakash L. Eukaryotic translesion synthesis DNA polymerases: specificity of structure and function // *Annu. Rev. Biochem.* 2005. V. 74. P. 317–353. doi: 10.1146/annurev.biochem.74.082803.133250
15. Wang Z., Xiao W. Distinct requirement for budding yeast Rev1 and Polη in translesion DNA synthesis across different types of DNA damage // *Curr. Genet.* 2020. V. 5. P. 1019–1028. doi: 10.1007/s00294-020-01092-w
16. Kozmin S.G., Pavlov Y.I., Kunkel T.A., Sage E. Roles of *Saccharomyces cerevisiae* DNA polymerases Polη and Polξ in response to irradiation by simulated sunlight // *Nucl. Acids Res.* 2003. 2003. V. 31. P. 4541–4552. doi: 10.1093/nar/gkg489
17. Sobolevska A., Halas A., Plachta M. et al. Regulation of the abundance of Y-family polymerases in the cell cycle of budding yeast in response to DNA damage // *Curr. Genet.* 2020. V. 66. P. 749–763. doi: 10.1007/s00294-020-01061-3
18. 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. doi: 10.37871/jbres1902
19. 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 Polη in *him1*-dependent mutagenesis // *Curr. Genet.* 2021. V. 67. P. 141–151. doi: 10.1007/s00294-020-01115-6
20. Zhao X., Chabes A., Domkin V. et al. The ribonucleotide reductase inhibitor Sml1 is a new target of the Mec1/Rad53 kinase cascade during growth and in response to DNA damage // *EMBO J.* 2001. V. 20. P. 3544–3553. doi: 10.1093/emboj/20.13.3544
21. Chabes A., Georgieva B., Domkin V. et al. Survival of DNA damage in yeast directly depends on increased dNTP levels allowed by relaxed feedback inhibition of ribonucleotide reductase // *Cell*. 2003. V. 112. P. 391–401. doi: 10.1016/s0092-8674(03)00075-8
22. Haracska L., Johnson R.E., Prakash L., Prakash S. Efficient and accurate replication in the presence of 7,8-dihydro-8-oxoguanine by DNA polymerase eta //

- Nature genet. 2000. V. 25. P. 458–461.
doi: 10.1038/78169
23. Watanabe K., Tateishi S., Kawasaji M. et al. Rad18 guides poleta to replication stalling sites through physical interaction and PCNA monoubiquitination // EMBO J. 2004. V. 23. P. 3886–3896.
doi: 10.1038/sj.emboj.7600383.
24. Durando M., Tateishi S., Vaziri C. A non-catalytic role of DNA polymerase eta in recruiting Rad18 and promoting PCNA monoubiquitination at stalled replication forks // Nucl. Acids Res. 2013. V. 41. P. 3079–3093.
doi: 10.1093/nar/gkt016
25. Ripley B.M., Gildenberg M.S., Washington M.T. Control of DNA damage bypass by ubiquitylation of PCNA // Genes. 2020. V. 11. P. 138.
doi.org/10.3390/genes11020138
26. Fedorova I.V., Gracheva L.M., Kovaltsova S.V. et al. The yeast *HSM3* gene acts in one of the mismatch repair pathways // Genetics. 1998. V. 148. P. 963–973.
doi: 10.1093/genetics/148.3.963

The Reparative DNA Polymerase eta (Polη) Plays A Key Role in Mutagenesis at Low Doses of UV Radiation in Yeast *Saccharomyces cerevisiae*

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

¹Konstantinov Petersburg Nuclear Physics Institute of the National Research Centre “Kurchatov Institute”, Leningrad oblast, Gatchina, 188300 Russia

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

Under normal conditions and when exposed to low doses of mutagens, DNA damage tolerance systems (DDT) are a key way to combat DNA damage in bacterial and eukaryotic cells. Two different DDT pathways, erroneous (translesion synthesis – TLS) and error-free (recombination), operate in all eukaryotic organisms. TLS involves the protein complex polymerase zeta (Polζ) (encoded by the genes *REV1*, *REV3* and *REV7*), and polymerase eta (Polη) (encoded by the *RAD30* gene); these polymerases are conserved from yeast to humans. We have shown that at low levels of UV radiation doses, a decisive role in mutagenesis is played by the high activity of Poly, which bypasses the overwhelming number of DNA damage that got in the way of the replication machine. Both in the case of irradiation with high and low doses of UV rays, checkpoint plays an important role in induced mutagenesis. However, the roles of genes involved in the regulation of UV-induced mutagenesis at low and high doses often differ. Inactivation of the *RAD30* gene at low doses leads to an increased level of induced mutagenesis, and at high doses it practically does not differ from the level of the wild-type strain. Deletions of the *HIM1*, *HSM3* and *HIF1* genes, on the contrary, reduce the high level of mutagenesis characteristic of high doses to the level of the wild-type strain at low doses. These differences characterize the local and global checkpoint.

Keywords: Polη, *S. cerevisiae*, checkpoint, low doses, UV-induced mutagenesis.