

## ФОСФАТАЗА Rph3 ВОВЛЕЧЕНА В РЕГУЛЯЦИЮ БЕЗОШИБОЧНОЙ ВЕТВИ ПОСТРЕПЛИКАТИВНОЙ РЕПАРАЦИИ В ДРОЖЖАХ *Saccharomyces cerevisiae*

© 2021 г. Д. В. Федоров<sup>1</sup>, Т. А. Евстюхина<sup>1</sup>, В. Т. Пешехонов<sup>1</sup>, В. Г. Королев<sup>1</sup>, \*

<sup>1</sup>Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова Национального исследовательского центра “Курчатовский институт”, Гатчина, 188300 Россия

\*e-mail: korolev\_vg@pnpi.nrcki.ru

Поступила в редакцию 18.02.2020 г.

После доработки 03.04.2020 г.

Принята к публикации 08.07.2020 г.

Фосфатазный комплекс РРН3 состоит из трех субъединиц: каталитической Rph3 и вспомогательных Rph2 и Psy4. Rph3 также образует двойной комплекс с субъединицей Psy2, который связывается с киназой Rad53 и дефосфорилирует ее без привлечения третьей субъединицы. Тройной комплекс дефосфорилирует  $\gamma$ H2A. Ранее мы показали, что ген *HSM6* соответствует гену *PSY4* на генетической карте *Saccharomyces cerevisiae*. Мутация *hsm6-1* повышает скорость спонтанного и частоту УФ-индуцированного мутагенеза. В настоящей работе мы показали, что мутации в гене *PPH3* увеличивают скорость спонтанного репаративного мутагенеза в 7 раз, при этом мутации *pph3Δ* и *hsm6-1* эпистатируют. При высоких дозах частота УФ-индуцированных мутаций у мутантов *pph3Δ*, *psy4Δ* и *hsm6-1* одинакова и превышает уровень мутагенеза в штамме дикого типа приблизительно двукратно. Все мутанты показывают более высокую (примерно 10-кратную) частоту  $\gamma$ -индуцированных мутаций по сравнению со штаммом дикого типа. Объединение мутаций в генах, кодирующих субъединицы РРН3, и мутаций в *MMS2* и *XRS2*, контролирующими безошибочный путь пострепликативной репарации, приводит к блокированию РРН3-специфического УФ-индуцированного мутагенеза. Таким образом, мы идентифицировали комплекс РРН3 в качестве нового фактора, вовлеченного в регуляцию безошибочной ветви пострепликативной репарации. Двойной мутант по генам *PTC2* и *PTC3*, кодирующим две другие фосфатазы, дефосфорилирующие Rad53, не отличается от штамма дикого типа в отношении УФ-индуцированного мутагенеза и выживаемости. Это означает, что гиперфосфорилирование только Rph3-специфических сайтов белка Rad53 и гистона H2A увеличивает уровень УФ-мутагенеза.

**Ключевые слова:** фосфатаза Rph3, репарация ДНК, дрожжи, толерантность, безошибочная ветвь репарации, мутагенез.

**DOI:** 10.31857/S0016675821010069

Стабильность геномной ДНК поддерживается в течение всего жизненного цикла клетки. Однако различные нарушения ее первичной структуры, индуцированные как в процессе нормального клеточного метаболизма, так и в ответ на факторы окружающей среды, возникают непрерывно. Повреждения структуры ДНК могут приводить к смерти клетки (летальные повреждения) или к генерации мутаций. Мутации являются первичной причиной наследственных болезней и рака, а также вносят вклад в процесс старения [1].

Хотя клетки содержат множество очень сложных систем для точного восстановления ДНК до ее первоначальной последовательности и структуры, иногда требуются механизмы, способные временно обеспечивать переносимость повреждения ДНК без посредничества репарации. Эти механизмы

толерантности способствуют выживанию после повреждения ДНК, а в некоторых ситуациях также активно способствуют возникновению мутаций. Толерантность к повреждению ДНК (tolerance to DNA damage – TDD) исторически называли пострепликативной репарацией (ПРР) из-за наблюдения, что обработка почкующихся дрожжевых клеток УФ-излучением вызывала одностранные (ОН) бреши в реплицирующейся ДНК [1]. УФ-индуцированные димеры пиримидинов, вызывающие ОН бреши в ДНК, часто сохранялись после “репарации”, что указывает на то, что ПРР просто обходит повреждение без его удаления [2]. Два различных пути TDD, ошибочный и безошибочный, действуют во всех эукариотических организмах [3]. Ошибочный путь TDD опосредуется синтезом через повреждения (TLS), в то время

как в безошибочном TDD одна вновь синтезированная нить служит матрицей для репликации другой заблокированной нити [4, 5]. Выбор между этими путями TDD имеет серьезные последствия для стабильности генома.

Клетки, дефектные в безошибочном пути TDD, характеризуются более выраженной зависимостью от TLS, демонстрируя более высокие уровни спонтанного мутагенеза и повышенную чувствительность к повреждению после инактивации компонентов ошибочной TDD [6]. Примечательно, что мутации в безошибочном пути придают большую чувствительность к ДНК-повреждающим агентам, чем мутации в пути TLS [7].

Эукариотические клетки имеют специализированный ответ на повреждение ДНК, называемый “чекпойнтом”, который задерживает развитие клеточного цикла и способствует репарации поврежденной ДНК. Активация чекпойнта осуществляется каскадом фосфорилирования белков и иницируется в клетках дрожжей двумя протеинкиназами, Mec1 и Tel1 [8]. Эти киназы фосфорилируют белки медиаторы чекпойнта, Rad53 и Rad9, а также гистон H2A [9, 10]. В настоящее время достигнут значительный прогресс в понимании иницирования и хода процесса чекпойнта. Однако о механизмах его прекращения известно мало. Поскольку Ser/Thr киназы (STK) играют центральную роль в инициации чекпойнта, вполне вероятно, что Ser/Thr фосфатазы (STP) должны быть вовлечены в его завершение. Процесс прекращения действия чекпойнта важен для повторной инициации репликации ДНК и выживания клеток. Этот процесс требует дефосфорилирования Rad53 и  $\gamma$ H2A. Было показано, что некоторые фосфатазы специфически продуцируют различные формы модификаций Rad53, которые необходимы для адекватного ответа на определенные повреждения ДНК [11].

В клетках дрожжей фосфатаза Pph3 участвует в дефосфорилировании ключевой чекпойнтной киназы Rad53 [12]. Pph3 образует комплекс с субъединицей Psy2, который связывается с киназой Rad53 и дефосфорилирует ее без участия третьей субъединицы. Другой комплекс, состоящий из трех субъединиц Pph3–Psy2–Psy4, дефосфорилирует  $\gamma$ H2A [13].

Ранее было обнаружено, что STP Pph3, Ptc2 и Ptc3 *S. cerevisiae* важны для дефосфорилирования Rad53 и, следовательно, для его дезактивации во время восстановления от воздействия MMS [14, 15]. FHA1-домен Rad53 взаимодействует со специфическим треонином Ptc2 [16]. Сверхэкспрессия Ptc2 индуцирует чувствительность к УФ и оксимочевине (HU) и летальна для мутантов *rad53*, *mec1* и *dun1* с низкой активностью рибонуклеотид-редуктазы. С другой стороны, делеция *PTC2* специфически подавляет гиперчувствительность *mec1* к

HU [17]. Предполагается, что Ptc2 и Ptc3 дефосфорилируют Rad53 конститутивно, и инактивация этого белка происходит после завершения репарации, что сопровождается снижением активности Mec1 [18].

Ранее нами был выделен мутантный штамм *S. cerevisiae hsm6-1*, характеризующийся повышенной скоростью спонтанного мутагенеза [19]. Эпистатический анализ показал, что мутация *hsm6-1* представляет собой аллель гена *PSY4*. Секвенирование мутантного аллеля *hsm6-1* выявило мутацию сдвига рамки считывания, которая вызвала замену Lys218Glu и генерацию стоп-кодона в следующей позиции. Точечная мутация *hsm6-1* имеет более выраженный фенотип по сравнению с делеционной мутацией *psy4Δ*. На основании полученных данных было сделано заключение, что ген *PSY4* играет ключевую роль в регуляции выхода клеток из чекпойнта, вызванного повреждением ДНК [20]. Полученные в настоящей работе результаты подтверждают это заключение.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### *Штаммы дрожжей и питательные среды*

Штаммы дрожжей *S. cerevisiae*, использованные в настоящем исследовании, перечислены в табл. 1. Для роста культуры и регистрации выживания использовали полную среду [21]. Спиртосодержащую среду использовали в исследованиях УФ-индуцированного мутагенеза [22]. Спонтанные мутации устойчивости к канаванину (CanS → CanR) регистрировали с использованием минимальной среды со стандартными добавками и 50 мг/мл канаванина.

### *Мутагены*

Источником ультрафиолетового света была лампа БУВ-30Е с мощностью дозы 1.4 Дж/м<sup>2</sup> с. Аппарат “Исследователь” с мощностью дозы 180 Гр/мин служил источником  $\gamma$ -лучей. Обработку дрожжей УФ-лучами и  $\gamma$ -лучами проводили как описано ранее [22].

### *Методы определения частоты мутаций*

Чувствительность к летальному воздействию ультрафиолетового излучения и  $\gamma$ -лучей определяли, используя кривые выживаемости. Чувствительность к мутагенному действию ультрафиолетового и  $\gamma$ -лучей была зарегистрирована индукцией прямых мутаций в пяти локусах, контролирующих синтез аденина, *ADE4–ADE8* [23]. Спонтанный мутагенез определяли с использованием стандартного метода медиан (флуктуационный тест), который регистрирует в основном ошибки репликации [24]. В других экспериментах скорость

**Таблица 1.** Штаммы дрожжей, используемые в работе

Штамм	Генотип	Происхождение
11D-3031	<i>MATα ade2Δ-248 ura3-160, 188 leu2-3, 112 trp1</i>	[26]
6B-SVK-312	<i>MATα ade2Δ-248 ura3-160, 188 leu2-3, 112 trp1 hsm6-1</i>	[20]
KFY-1073	<i>MATα ura3Δ leu2-his3-1 met15Δ pph3Δ::KanMX</i>	Настоящая работа
60-TAE-3031	<i>MATα ade2Δ-248 ura3-160, 188 leu2-3, 112 trp1 psy4::NAT</i>	[20]
62-TAE-3032	<i>MATα ade2Δ-248 ura3-160, 188 leu2-3, 112 trp1 pph3::KanMX</i>	Настоящая работа
63-TAE-3033	<i>MATα ade2Δ-248 ura3-160, 188 leu2-3, 112 trp1 hsm6-1 pph3::KanMX</i>	»
23-DVF-3031	<i>MATα ade2Δ-248 ura3-160, 188 leu2-3, 112 trp1 ptc2::NAT ptc3::KanMX</i>	»
24-DVF-3031	<i>MATα ade2Δ-248 ura3-160, 188 leu2-3, 112 trp1 mms2::KanMX</i>	»
25-DVF-3031	<i>MATα ade2Δ-248 ura3-160, 188 leu2-3, 112 trp1 pph3::KanMX mms2::KanMX</i>	Настоящая работа
26-DVF-3031	<i>MATα ade2Δ-248 ura3-160, 188 leu2-3, 112 trp1 xrs2::URA3</i>	[27]
27-DVF-3031	<i>MATα ade2Δ-248 ura3-160, 188 leu2-3, 112 trp1 hsm6-1 xrs2::URA3</i>	Настоящая работа

спонтанных мутаций устойчивости к канаванину оценивали по методу упорядоченного посева Хромова-Борисова [25]. 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 (10<sup>6</sup> клеток/мл). Специальный репликатор на 150 штырей был погружен в эту суспензию и перенесен на чашку Петри со средой, содержащей канаванин. Репликатор переносил 150 равных капель дрожжевой суспензии (около 2 мкл каждая) на равных расстояниях друг от друга, каждая капля содержала приблизительно 2000 клеток. Концентрация канаванина 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 канаванину, 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 доверительными интервалами.

*Конструирование штаммов*

Для разрушения открытой рамки считывания гена *PPH3* (*YDR075W*) клетки штамма дрожжей дикого типа (11D-3031) (табл. 1) трансформировали фрагментом ДНК, содержащим маркер *KanMX*, с фланкирующими 22-нуклеотидными последовательностями, гомологичными флангам гена *PPH3*. Фрагмент генерировали путем ПЦР-ам-

плификации с праймерами Pph3-1 и Pph3-2 и ДНК, выделенной из штамма KFY-1073 в качестве матрицы. Последовательности ДНК всех использованных в настоящей работе праймеров приведены в табл. 2. Трансформанты с делецией гена *PPH3* отбирали по их устойчивости к G418 с использованием полной среды, содержащей G418 в концентрации 200 мкг/мл. Разрушение гена *PPH3* было подтверждено с помощью ПЦР.

Для получения одиночного *mms2Δ* и двойного *hsm6-1 mms2Δ* мутантов клетки штамма дикого типа 11D-3031 (табл. 1) и мутанта *hsm6-1* 6B-SVK-312 (табл. 1) трансформировали фрагментом ДНК, содержащим кассету *KanMX4* с фланкирующими 70-нуклеотидными последовательностями, гомологичными флангам гена *MMS2*. Фрагмент получали посредством ПЦР-амплификации плазмиды pFLA6A-KanMX4 с праймерами *MMS2\_L* и *MMS2\_R*. Трансформанты также отбирали по их устойчивости к G418 описанным выше способом. Полное замещение гена *MMS2* в полученных штаммах было подтверждено с помощью ПЦР.

Для получения двойного мутанта *ptc2Δ ptc3Δ* клетки штамма дикого типа трансформировали фрагментом ДНК, содержащим кассету *natMX6* с фланкирующими 70-нуклеотидными последовательностями, гомологичными флангам гена *PTC2*. Фрагмент получали путем ПЦР-амплификации плазмиды PFLA6A-natMX6 с праймерами *PTC2\_L* и *PTC2\_R*. Трансформантов отбирали по их устойчивости к нурсеотрицину на полной среде, содержащей *clonNAT* в концентрации 30 мг/л. Далее клетки полученного штамма трансформировали фрагментом ДНК, содержащим кассету *kanMX4* с фланкирующими 70-нуклеотидными последовательностями, гомологичными флангам гена *PTC3*. Фрагмент получали с помощью ПЦР-амплификации плазмиды PFLA6A-kanMX4 с праймерами *PTC3\_L* и *PTC3\_R*. Трансформантов отбирали по их устойчивости к геницину на

Таблица 2. Праймеры, использованные в работе

Название	Последовательность
Pph3-1	5'-GTCAATATGTGGTGTTCGACG-3'
Pph3-2	5'-СТААТCCTGTGATGCCGCTACT-3'
MMS2_L	5'-TCGATGTCGTGGTGAААТТCТТАТТCТGTATATGCAACGТAGAAAGCAGCGТТТАСАСАА AAATGTCGCTTCGTACGCTGCAGGTСG-3'
MMS2_R	5'-TTGGAATGCTGCAAАТACTGTTTAGGAAAAAGTAGATAACTAAAAGTTTCTCCTTCCTTCGG TTGACGCGCATAGGCCACTAGTGGATC-3'
PTC2_L	5'-CCTCCCCACGGAAТAAAАCTACAACAAGTTCTGTТATCAAGGACAATTAGTGT ATATTAGTTGTTGTAACGCTTCGTACGCTGCAGGTСG-3'
PTC2_R	5'-GGTAGTGGTGTATGCTCTTGGTTCTGGTGGTGTCTTGCCTTCTCTTCTTTCTGT TCGTTCGGTTCCGCATAGGCCACTAGTGGATC-3'

полной среде, содержащей G418 в концентрации 300 мг/л. Разрушение генов *PTC2* и *PTC3* в полученном штамме было подтверждено при помощи ПЦР.

Двойной мутант *hsm6-1 xrs2Δ* был получен путем трансформации клеток штамма *hsm6-1* 6В-SVK-312 (табл. 1) фрагментом ДНК, полученным в результате рестрикции плазмиды pE139 по сайтам *Bam*HI и *Hind*III. Трансформантов отбирали на селективной среде без урцила.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### Влияние мутации *pph3Δ* на спонтанный мутагенез

Известно, что клетки *pph3Δ* показывают гиперчувствительность к репликативному стрессу, индуцированному ДНК-алкилирующим агентом MMS. Более того, при воздействии MMS клетки мутанта *pph3Δ* показывают гиперактивацию белка Rad53, задержку входа в S-фазу клеточного цикла и проявляют ухудшение процессинга объединенных хромосомных структур [28]. Эти результаты показывают, что наблюдаемые дефекты являются следствием ухудшения регуляции активации белка Rad53.

Для лучшего понимания функции субъединиц комплекса РРН3 мы проанализировали генетические свойства клеток, мутантных по гену *PPH3*. Флуктуационный тест медиан [24] и метод упорядоченного посева [25] были использованы для определения скорости спонтанных мутаций устойчивости к канаванину у мутанта *pph3Δ*. Ранее мы показали, что скорость спонтанных мутаций, измеренная флуктуационным тестом, в одноклеточном *psy4Δ* не отличалась от скорости в клетках дикого типа:  $(3.8 \pm 1.1) \times 10^{-7}$  и  $(3.2 \pm 0.6) \times 10^{-7}$  соответственно. В то же время мутация *hsm6-1* увеличивает скорость спонтанного мутагенеза более чем в 5 раз [20]. Измеренная нами скорость репликативных мутаций в мутанте *pph3Δ* не отличалась от скорости в клетках дикого типа —  $(3.8 \pm$

$\pm 1.14) \times 10^{-7}$ . С другой стороны, метод упорядоченного посева показывает значительные различия между мутантами и штаммом дикого типа: wt —  $(3.2 \pm 0.62) \times 10^{-7}$ , *psy4Δ* —  $(10.2 \pm 2.64) \times 10^{-7}$ , *hsm6-1* —  $(34.4 \pm 4.2) \times 10^{-7}$  [20], *pph3Δ* —  $(52.7 \pm \pm 6.04) \times 10^{-7}$ , *hsm6-1 pph3Δ* —  $(58.5 \pm 7.04) \times 10^{-7}$ . Эти результаты показывают, что мутации *psy4Δ* и *pph3Δ* не изменяют скорости репликативного мутагенеза, но они значительно увеличивают скорость репаративного мутагенеза. К тому же инактивация гена *PSY4* увеличивает скорость репаративного мутагенеза в значительно меньшей степени, чем инактивация гена *PPH3*, что подтверждает разное влияние этих мутаций на репарационные процессы.

### Эффект мутаций *pph3Δ* и *hsm6 pph3Δ* на УФ-индуцированный мутагенез и выживаемость

Мутации ряда генов, контролирующих репарацию предмутационных повреждений ДНК, показывают спонтанный мутаторный фенотип и в то же время такие мутанты могут быть чувствительными к летальному и мутагенному действию различных мутагенов. Ранее мы показали, что мутация *psy4Δ* не влияет на УФ-чувствительность клеток дрожжей и слабо повышает уровень УФ-индуцированного мутагенеза [20]. В связи с этим мы измерили выживаемость и частоту мутаций *ade4-ade8* в изучаемых штаммах при УФ-облучении. Одиноклеточный мутант *psy4Δ* не отличается по УФ-чувствительности от штамма дикого типа. В то же время мутант *hsm6-1* показал заметно большую УФ-чувствительность по сравнению со штаммом дикого типа [20]. Мутанты *hsm6-1*, *pph3Δ* и двойной *pph3Δ hsm6-1* показали примерно одинаковую УФ-чувствительность (рис. 1, а).

Так как генетические эффекты мутации *pph3* не были изучены в деталях, мы определили влияние делеции гена *PPH3* на УФ-индуцированный мутагенез. Частота прямых мутаций в генах *ADE4-ADE8* при УФ-облучении была оценена в клетках дикого типа и мутантах *hsm6-1*, *pph3Δ* и

*pph3Δ hsm6-1* (рис. 1,б). Представленные кривые индуцированного мутагенеза показывают, что при низких дозах облучения частота мутаций в клетках дикого типа, мутантах *pph3Δ* и *pph3Δ hsm6-1* была одинакова и значительно ниже (~в 3 раза) по сравнению с одиночным мутантом *hsm6-1*. При высоких дозах частота мутаций во всех трех мутантных штаммах была одинакова и превышала уровень мутагенеза в клетках дикого типа примерно вдвое. Таким образом, мутация *hsm6-1* проявляет значительно более выраженный эффект по сравнению с делецией всего гена, в то же время мутация *pph3Δ* полностью эпистатирует к мутации *hsm6-1*.

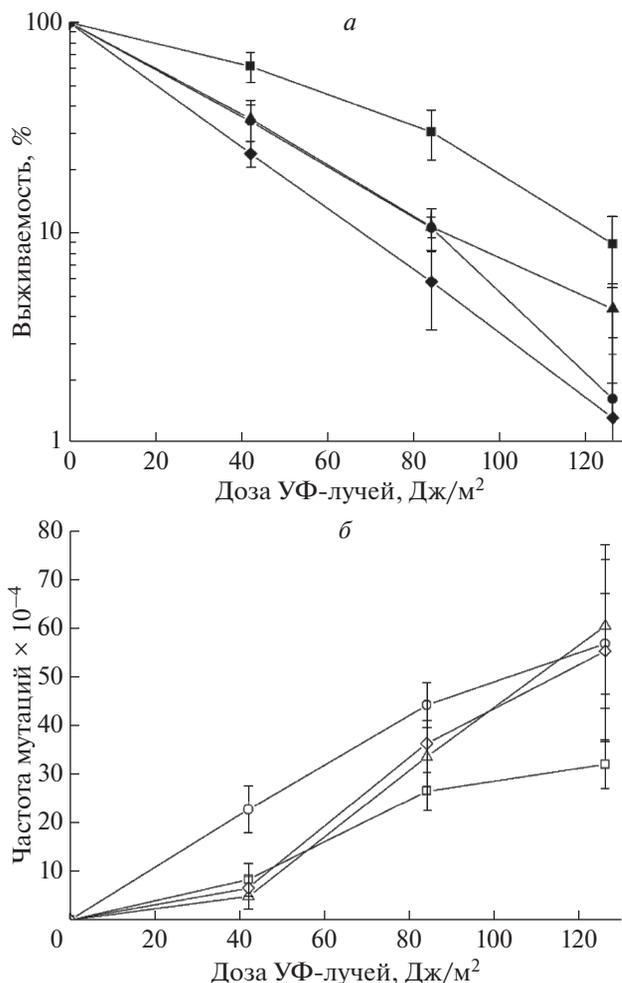
*Выживаемость и мутагенез у мутантов hsm6-1, psy4, pph3Δ и pph3Δ hsm6-1 при γ-облучении*

Для индукции двунитевых разрывов (ДНР) ДНК мы использовали γ-лучи. Данные по сравнению выживаемости штамма дикого типа и мутантов *hsm6-1*, *psy4*, *pph3Δ* и *pph3Δ hsm6-1*, полученные в количественном тесте, представлены на рис. 2,а. Из этого рисунка видно, что существенных различий в γ-чувствительности штамма дикого типа и мутантов не наблюдается. Более того, почкующиеся клетки всех штаммов, инактивация которых характеризуется пологим участком кривой инактивации, показали одинаковую чувствительность. Возможно, небольшие различия в первоначальном наклоне кривых выживаемости объясняются различным соотношением доли почкующихся клеток в облучаемых культурах.

Частота прямых мутаций в генах *ADE4–ADE8* была оценена после γ-облучения в штамме дикого типа и мутантах *hsm6-1*, *psy4Δ*, *pph3Δ* и *pph3Δ hsm6-1* (рис. 2,б). Все мутанты проявили более высокую частоту γ-индуцированного мутагенеза по сравнению со штаммом дикого типа. Следует отметить, что различие в частоте мутаций между штаммом дикого типа и мутантами было значительно больше, чем при УФ-облучении.

*Эффект УФ-облучения на выживаемость и мутагенез у двойного мутанта ptc2Δ ptc3Δ*

Ptc2 и Ptc3 были первыми протеинфосфатазами, для которых показано влияние на дезактивацию чекпойнта, индуцированного повреждением ДНК [14]. Клетки, потерявшие все три фосфатазы Pph3, Ptc2 и Ptc3, проявляют синергическую чувствительность к ДНК-повреждающим агентам камптотетину, NU и MMS, но не к УФ-лучам [29]. Для изучения вовлеченности фосфатаз Ptc2 и Ptc3 в УФ-индуцированный мутагенез мы создали мутантные клетки, потерявшие гены *PTC2* и *PTC3*. Вначале мы тестировали выживаемость мутанта *ptc2 ptc3* после УФ-облучения. Как видно из рис. 3, клетки двойного мутанта не показали

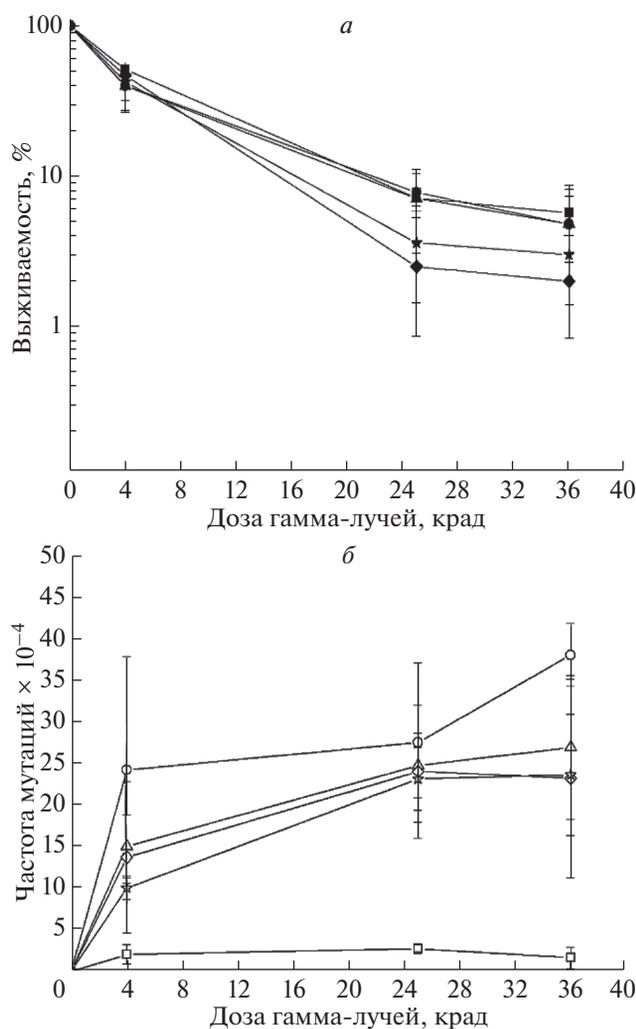


**Рис. 1.** Выживаемость (а) и частота мутаций по пяти локусам *ADE4–ADE8* (б) при действии разных доз УФ на клетки дрожжей: штамм дикого типа (■, □), мутант *pph3::KanMX* (●, ○), мутант *hsm6-1* (▲, △), двойной мутант *hsm6-1 pph3::KanMX* (◆, ◇).

повышенной чувствительности по сравнению с клетками дикого типа. УФ-индуцированный мутагенез в этих штаммах также оказался одинаковым (рис. 3). Таким образом, гиперфосфорилирование Ptc2/3-зависимых сайтов белка Rad53 не влияет на УФ-индуцированный мутагенез и выживаемость клеток дрожжей.

*Белковый комплекс PPH3 вовлечен в регуляцию безошибочной ветви ПРР*

Ранее мы сообщали, что мутация *hsm6-1* увеличивает частоту УФ-индуцированного мутагенеза и снижает уровень УФ-индуцированного митотического кроссинговера в области между центромером и геном *ADE2*. Мутант *hsm6* показывает увеличенную скорость спонтанного и УФ-индуцированного мутагенеза, при этом увеличение сильно зависит от гена *REV3*, кодирующего спе-

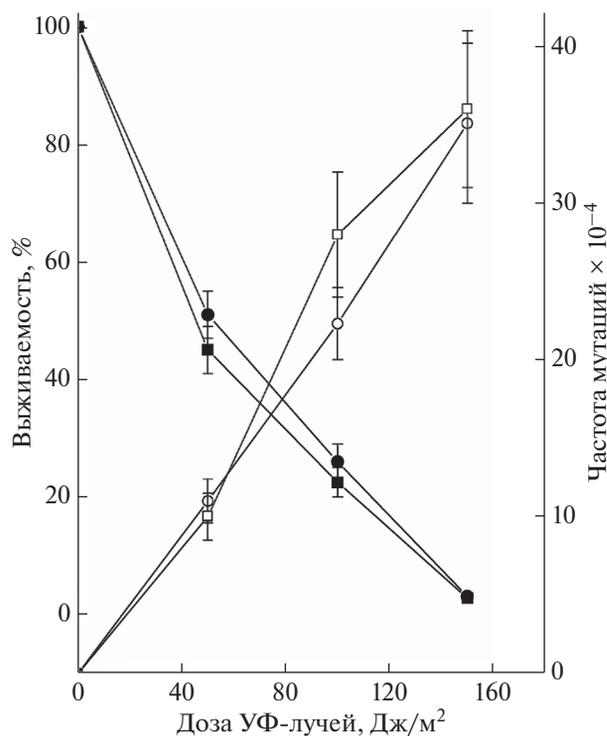


**Рис. 2.** Выживаемость (а) и частота мутаций по пяти локусам *ADE4–ADE8* (б) при действии разных доз гамма-лучей на клетки дрожжей: штамм дикого типа (■, □), мутант *hsm6-1* (●, ○), мутант *psy4::NAT* (★, ☆), мутант *pph3::KanMX* (◆, ◇), двойной мутант *hsm6-1 pph3::KanMX* (▲, △).

цифическую ДНК-полимеразу [20, 30]. Эти результаты показывают, что *HSM6* может участвовать в одной из ветвей ПРР.

Белок Rad5 вовлечен в безошибочную ветвь ПРР [31]. Белок Mms2, обладающий в комплексе с Ubc13p убиквитинтрансферазной активностью, является субъединицей тройного комплекса Rad5–Mms2–Ubc13, который осуществляет полиубиквитинирование PCNA и таким образом стимулирует рекомбинационно-подобный процесс. Отсюда следует, что ген *MMS2* контролирует первую стадию безошибочной ветви ПРР.

Для проверки предположения, что ген *PPH3* может быть вовлечен в контроль безошибочной ветви ПРР, мы разрушили ген *MMS2* в мутанте *pph3* и штамме дикого типа. Как видно из рис. 4,



**Рис. 3.** Выживаемость (темные символы) и частота мутаций по пяти локусам *ADE4–ADE8* (светлые символы): штамм дикого типа (■, □), двойной мутант *ptc2Δ ptc3Δ* (●, ○).

УФ-индуцированный мутагенез в мутанте *mms2* значительно ниже, чем в одиночном мутанте *pph3*, и близок к уровню штамма дикого типа. Двойной мутант *mms2 pph3* показывает уровень УФ-индуцированного мутагенеза такой же, как у одиночного *mms2*. Следовательно, мутации *mms2* и *pph3* находятся на одном пути репарации и *mms2* эпистатирует к *pph3*.

Показано, что ОН бреши ДНК за остановленными репликационными вилками обусловлены Mre11-зависимой деградацией реплицированной ДНК. Это событие определяет вторую стадию безошибочной ветви ПРР. Образование ОН бреши со свободным 3'-концом стимулирует инвазию вновь синтезированной ДНК в дуплексную ДНК сестринской хроматиды, таким образом инициируя смену матриц. Мы исследовали потенциальные эпистатические отношения между мутациями генов *XRS2* и *PPH3*. *Xrs2* является субъединицей комплекса MRE11. Штамм дикого типа был слабо чувствителен к УФ-облучению и не оказывал заметного влияния на УФ-индуцированный мутагенез (рис. 5). Двойной мутант *xrs2 pph3* был также чувствителен к УФ-индукционному летальному действию и мутагенезу, как и одиночный мутант *xrs2* (рис. 5). Таким образом, эти результаты согласуются с ролью *PPH3* в безошибочном пути обхода повреждений.

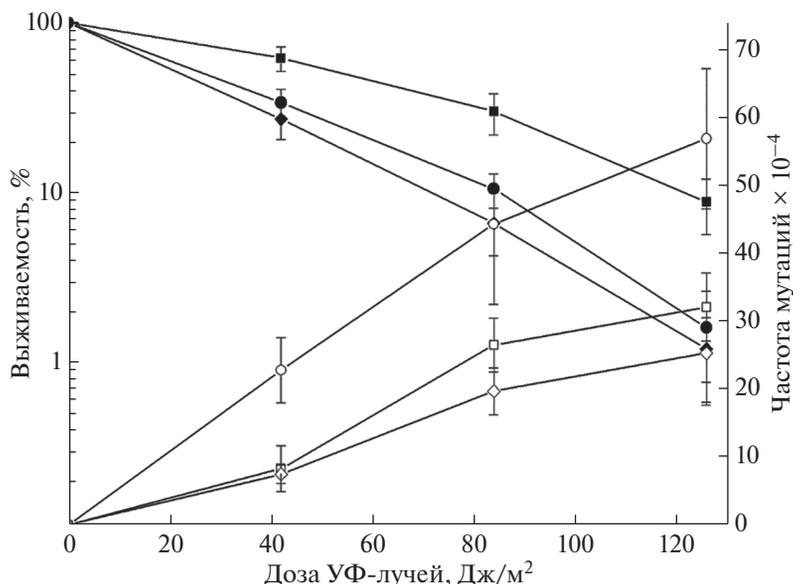


Рис. 4. Выживаемость (темные символы) и частота мутаций по пяти локусам *ADE4–ADE8* (светлые символы): штамм дикого типа (■, □), мутант *pph3* (●, ○), мутант *mms2* (▲, △), двойной мутант *pph3 mms2* (◆, ◇).

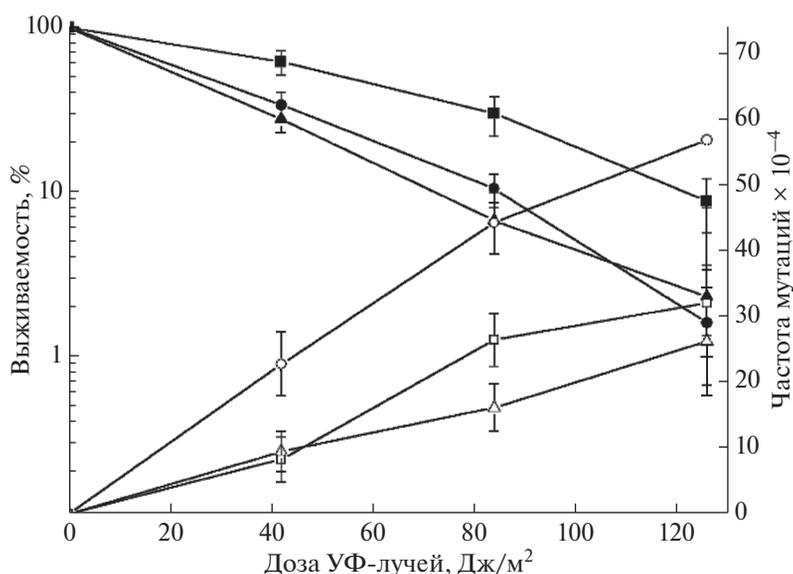


Рис. 5. Выживаемость (темные символы) и частота мутаций по пяти локусам *ADE4–ADE8* (светлые символы): штамм дикого типа (■, □), мутант *pph3* (●, ○), двойной мутант *pph3 xrs2* (▲, △).

### ОБСУЖДЕНИЕ

При благоприятных условиях роста основной причиной спонтанного мутагенеза являются ошибки репликации. Именно поэтому флукуационный тест учитывает спонтанные мутации, возникшие в основном в результате ошибок репликации. Мутации, возникающие как ошибки репликации, так и ошибки репарации, регистрируются методом упорядоченного посева, когда клетки выращиваются в течение длительных периодов на селективной

среде, и многие спонтанные повреждения накапливаются в ДНК в течение одного поколения [26]. Если клетки имеют дефект в репарационных системах, это может значительно увеличить уровень спонтанного мутагенеза.

Частота спонтанных мутаций устойчивости к канаванину, измеренная с помощью флукуационного теста для мутанта *pph3Δ*, не отличалась от штамма дикого типа. Однако в тесте Хромова-Борисова мутация *pph3* проявляет очень высокий

уровень спонтанного мутагенеза, который аналогичен двойному мутанту *pph3Δ hsm6-1*. На основании этих данных мы можем предположить, что мутации *pph3Δ*, *psy4Δ* и *hsm6-1* стимулируют подверженный ошибкам процесс репарации ДНК.

При воздействии MMS клетки *pph3Δ* проявляют гиперактивацию Rad53 и задержку внутри-S-фазного чекпойнта [12, 28]. Однако Rph3-Psy2 не является единственной фосфатазой, необходимой для дефосфорилирования Rad53. Фосфатазы Pp2C, Ptc2 и, в меньшей степени, Ptc3 необходимы для дефосфорилирования Rad53 после ДНР ДНК [13]. Учитывая, что Rph3-Psy2, по-видимому, регулирует некоторые чекпойнтные функции Rad53, но не все, можно предположить, что Rph3 и Ptc2/Ptc3 не являются избыточными, поскольку они распознают разные формы фосфорилирования Rad53, и что эти разные формы фосфорилирования независимо регулируют различные аспекты чекпойнта ответа [13]. Чтобы лучше понять функциональное взаимодействие между фосфатазами Rph3-Psy2 и Ptc2/Ptc3, мы проанализировали индуцированный ультрафиолетом мутагенез в клетках, лишенных Ptc2/Ptc3. Как показано на рис. 3, двойной мутант *ptc2 ptc3* не проявляет какой-либо чувствительности к ультрафиолетовому излучению и не увеличивает уровня индуцированного ультрафиолетом мутагенеза. Взятые вместе эти результаты согласуются с моделью, в которой основной причиной более высокого уровня мутаций, индуцированных ультрафиолетом в мутанте *pph3*, является замедление дефосфорилирования РРНЗ-специфических сайтов Rad53 и  $\gamma$ H2A.

Фосфатаза Rph3-Psy2-Psy4 образует стабильный комплекс с  $\gamma$ H2A, т.е. реакция дефосфорилирования гистона является медленным процессом [32].  $\gamma$ H2A теряется из хроматина независимо от РРНЗ, что указывает на то, что фосфатаза нацеливается на  $\gamma$ H2A после его вытеснения из ДНК. Дефосфорилирование  $\gamma$ H2A с помощью РРНЗ необходимо для эффективного выхода из чекпойнта, индуцированного повреждениями ДНК [13]. Ранее мы предполагали, что чувствительность мутанта *hsm6-1* к ультрафиолетовому излучению и его высокая спонтанная и зависящая от ультрафиолетового излучения изменчивость обусловлены задержанным выходом клетки из чекпойнта [20]. После облучения УФ-лучами в процессе репликации на поврежденной ДНК образуются односторонние ДНР. У мутантов *psy4Δ* и *pph3Δ* значительное увеличение уровня мутагенеза наблюдалось только при высоких дозах УФ-облучения (рис. 1,б), поскольку в этом случае вероятность появления ДНР ДНК и индукции чекпойнта заметно возрастает. Количество выделяющегося  $\gamma$ H2A будет высоким, что повлияет на уровень индуцированного мутагенеза.

Репарация одностороннего ДНР отличается от репарации двустороннего ДНР. Когда индуцируется двусторонний ДНР, гистон H2A фосфорилируется на большем расстоянии с обеих сторон ДНР, что приводит к индукции множества  $\gamma$ H2A [33]. Мы предполагаем, что увеличение количества  $\gamma$ H2A может привести к более высокому уровню индуцированного мутагенеза. Чтобы проверить это предположение, мы использовали  $\gamma$ -лучи, которые индуцируют ДНР ДНК с двумя концами с высокой частотой. Действительно, частота мутаций, индуцированных  $\gamma$ -лучами, у всех исследованных мутантов была чрезвычайно высокой по сравнению со штаммом дикого типа (рис. 2,б). Белок Rph3 является каталитической субъединицей фосфатазного комплекса Rph3-Psy2-Psy4, биохимическая функция которого – дефосфорилирование гистонов  $\gamma$ H2A [13]. Мутации *hsm6-1* и *psy4Δ* инактивируют тройной комплекс фосфатазы. С другой стороны, мутация *pph3Δ* инактивирует обе функции фосфатазного комплекса РРНЗ, при этом мы фиксируем при высоких дозах одинаково высокие уровни УФ- и  $\gamma$ -индуцированного мутагенеза у всех трех мутантов (рис. 1,б и 2,б). Следовательно, замедление дефосфорилирования  $\gamma$ H2A является основной причиной увеличения скорости индуцированного мутагенеза у мутантов *pph3Δ*, *hsm6-1* и *psy4Δ*. Этот вывод подтверждается, во-первых, данными по УФ-индуцированному мутагенезу в клетках, потерявших фосфатазу Ptc2/Ptc3, которая не имеет отношения к дефосфорилированию  $\gamma$ H2A, но дефосфорилирует белок Rad53. Во-вторых, полным совпадением кривых УФ-мутагенеза у мутантов *pph3Δ* и *psy4Δ* (рис. 1,б).

В дрожжах открыта еще одна фосфатаза Glc7, которая способна дефосфорилировать гистон  $\gamma$ H2A [34]. Наличие в клетке одновременно двух фосфатаз, способных дефосфорилировать гистон  $\gamma$ H2A, должно приводить к конкуренции за субстрат. Когда в клетке присутствуют оба фермента, количество свободного  $\gamma$ H2A будет быстро уменьшаться и освобождать комплекс Rph3-Psy2-Psy4 от связывания с гистоном. Это, в свою очередь, сместит равновесие между комплексами Rph3-Psy2-Psy4 и Rph3-Psy2 в сторону последнего. В отсутствие Glc7 (мутант *glc7*) дефосфорилирование гистона  $\gamma$ H2A значительно замедлится, что приведет к его повторному включению в хроматин. Однако отсутствие Glc7 лишь замедляет процесс выхода из чекпойнта, но не блокирует его, из-за активности второго фермента Rph3-Psy2-Psy4. Делеция гена *PSY4* также замедлит дефосфорилирование гистона  $\gamma$ H2A. Таким образом, при низких дозах УФ-лучей отсутствие одного из белков Psy4 или Glc7 не будет заметно сказываться на скорости дефосфорилирования  $\gamma$ H2A. Однако при высокой концентрации этого гистона в ядре (высокие дозы УФ-лучей или при  $\gamma$ -облуче-

нии) отсутствие одного из партнеров окажет заметное влияние на эффективность дефосфорилирования  $\gamma$ H2A. Мутация *hsm6-1* относится к типу сдвиг рамки считывания. В результате образуется укороченный белок, который сохранил консервативную последовательность на N-конце. Можно предполагать, что такой укороченный белок способен формировать тройной комплекс РРНЗ, но не способен выполнять в полном объеме свою ферментативную функцию. Это приведет к замедлению дефосфорилирования гистона  $\gamma$ H2A, значительному увеличению времени существования нефункционального тройного комплекса, связанного с  $\gamma$ H2A, и, как следствие, снижению эффективности дефосфорилирования Rad53. Эти свойства аллеля *hsm6-1* будут отличать его от делеционного мутанта.

В совокупности мы интерпретируем эти результаты как указание на то, что высокий спонтанный мутагенез у мутантов *hsm6-1* и *pph3Δ* и высокая чувствительность к мутагенному действию ультрафиолетовых и  $\gamma$ -лучей обусловлены задержкой выхода клетки из чекпойнта.

Ранее мы предполагали, что ген *HSM6* участвует в контроле ПРР [19, 20]. Проведенный нами генетический анализ подтверждает это предположение. Прежде всего мы показываем, что мутации *mms2* и *xrs2* способны полностью подавлять более высокий УФ-индуцированный мутагенез мутанта *pph3* (рис. 4, 5). Этот фенотип самым строгим образом определяет гены, контролируемые субъединицы белкового комплекса РРНЗ, в качестве участников в регуляции безошибочной ветви ПРР.

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта РФФИ № 18-34-005540 мол\_а и в рамках государственного задания по теме “Мультикомпонентные биологические системы: структурно-динамическая и функциональная организация” (регистрационный номер АААА-А19-119091890069-7).

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. 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.
2. Ganesan A.K. Persistence of pyrimidine dimers during post-replication repair in ultraviolet light-irradiated *Escherichia coli* K12 // *J. Mol. Biol.* 1974. V. 87. P. 103–119.
3. Sale J.E. Competition, collaboration and coordination-determining how cells bypass DNA damage // *J. Cell Sci.* 2012. V. 125. P. 1633–1643.
4. Branzei D., Vanoli F., Foiani M. SUMOylation regulates Rad18-mediated template switch // *Nature.* 2008. V. 456. P. 915–920.
5. Giannattasio M., Zwicky K., Follonier C. et al. Visualization of recombination-mediated damage bypass by temple switching // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2014. V. 21. P. 884–892.
6. Cejka P., Vondrejcs V., Storchova Z. Dissection of the functions of the *Saccharomyces cerevisiae* RAD6 post-replicative repair group in mutagenesis and UV sensitivity // *Genetics.* 2001. V. 159. P. 953–963.
7. Brusky J., Zhu Y., Xiao W. *UBC13*, a DNA-damage-inducible gene, is a member of the error-free postreplication repair pathway in *Saccharomyces cerevisiae* // *Curr. Genet.* 2000. V. 37. P. 168–174.
8. Paciotti V., Clerici M., Lucchini G., Longhese M.P. The checkpoint protein Ddc2, functionally related to *S. pombe* Rad26, interacts with Mec1 and is regulated by Mec1-dependent phosphorylation in budding yeast // *Genes Dev.* 2000. V. 14. P. 2046–2059.
9. Redon C., Pilch D.R., Rogakou E.P. et al. Yeast histone 2A serine 129 is essential for efficient repair of checkpoint-blind DNA damage // *EMBO Rep.* 2003. V. 4. P. 678–684.
10. Sanchez Y., Desany B.A., Jones W.J. et al. Regulation of RAD53 by the ATM-like kinases Mec1 and Tel1 in yeast cell cycle checkpoint pathways // *Science.* 1996. V. 271. P. 357–360.
11. Travesa A., Duch A., Quintana D.G. Distinct phosphatases mediate the deactivation of the DNA damage checkpoint kinase Rad53 // *J. Biol. Chem.* 2008. V. 283. P. 17123–17130.
12. O'Neill B.M., Szyjka S.J., Lis E.T. et al. Pph3–Psy2 is a phosphatase complex required for Rad53 dephosphorylation and replication fork restart during recovery from DNA damage // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2007. V. 104. P. 9290–9295.
13. Keogh M.C., Kim J.A., Downey M. et al. A phosphatase complex that dephosphorylates  $\gamma$ H2AX regulates DNA damage checkpoint recovery // *Nature.* 2006. V. 439. P. 497–501.
14. Leroy C., Lee S.E., Vaze M.B. et al. PP2C phosphatases Ptc2 and Ptc3 are required for DNA checkpoint inactivation after a double-strand break // *Mol. Cell.* 2003. V. 11. P. 827–835.
15. Szyjka S.J., Aparicio J.G., Viggiani C.J. et al. Rad53 regulates replication fork restart after DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae* // *Genes Dev.* 2008. V. 22. P. 1906–1920.
16. Guillemain G., Ma E., Mauger S. et al. Mechanisms of checkpoint kinase Rad53 inactivation after a double-strand break in *Saccharomyces cerevisiae* // *Mol. Cell Biol.* 2007. V. 27. P. 3378–3389.
17. Marsolier M.C., Roussel P., Leroy C., Mann C. Involvement of the PP2C-like phosphatase Ptc2 in the DNA checkpoint pathways of *Saccharomyces cerevisiae* // *Genetics.* 2000. V. 154. P. 1523–1532.
18. Heideker J., Lis E.T., Romesberg F.E. Phosphatase, DNA damage checkpoints and checkpoint deactivation // *Cell Cycle.* 2007. V. 6. P. 3058–3064.
19. Иванов Е.Л., Федорова И.В., Ковальцова С.В. Изоляция и характеристика новых мутантов *Saccharo-*

- myces cerevisiae* с увеличенной спонтанной мутабельностью // Генетика. 1992. Т. 28(5). С. 47–55.
20. Федоров Д.В., Ковальцова С.В., Евстюхина Т.А. и др. Ген *HSM6* идентичен гену *PSY4* у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* // Генетика. 2013. Т. 49. № 3. С. 328–336.
  21. Захаров И.А., Кожин С.А., Кожина Т.Н., Федорова И.В. Сборник методик по генетике дрожжей-сахаромисетов. Л.: Наука, 1984. 112 с.
  22. Ковальцова С.В., Королев В.Г. Штамм дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* для тестирования мутагенов среды, основанный на взаимодействии мутаций *rad2* и *him1* // Генетика. 1996. Т. 32. № 3. С. 366–372.
  23. Roman H. A system selective for mutations affecting the synthesis of adenine in yeast // Compt. Rend. Trav. Lab. Carlsberg. Ser. Physiol. 1956. V. 26. P. 299–314.
  24. Lea D.E., Coulson C.A. The distribution of the number of mutants in bacterial populations // J. Genet. 1949. V. 49. P. 264–285.
  25. Khromov-Borison N.N., Saffi J., Henriques J.A.P. Perfect order plating: principal and applications // ТТО. 2002. V. 1. P. TO2638.
  26. 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.
  27. Черненко А.Ю., Грачева Л.М., Евстюхина Т.А. и др. Взаимодействие гена *HSM3* с генами эпистатической группы *RAD6* дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* // Генетика. 2012. Т. 48. № 2. С. 160–167.
  28. Jablonowski C.M., Cussiol J.R., Oberly S. et al. Termination of replication stress signaling via concerted ac-
  - tion of the Slx4 scaffold and the PP4 phosphatase // Genetics. 2015. V. 115. <https://doi.org/10.1534/genetics.181479>
  29. Kim J.-A., Hicks W.M., Li J. et al. Orotein phosphatases Pph3, Ptc2, and Ptc3 play redundant roles in DNA double-strand break repair by homologous recombination // Mol. Cell. Biol. 2011. V. 31. P. 507–516.
  30. Ковальцова С.В., Грачева Л.М., Евстюхина Т.А. и др. Гены-мутаторы дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Взаимодействие мутаций *him* и *hsm* с мутациями, блокирующими три основных пути репарации индуцированных повреждений ДНК // Генетика. 1996. Т. 32. № 8. С. 1061–1067.
  31. Johnson R.E., Henderson S.T., Petes T.D. et al. *Saccharomyces cerevisiae* *RAD5*-encoded DNA repair protein contains DNA helicase and zinc-binding sequence motifs and affects on stability of simple repetitive sequences in the genome // Mol. Cell. Biol. 1992. V. 12. P. 3807–3818.
  32. Vazquez-Martin C., Rouse J., Cohen P.T.W. Characterization of the role of a trimeric protein phosphatase complex in recovery from cisplatin-induced versus noncrosslinking DNA damage // FEBS J. 2008. V. 275. P. 4211–4221.
  33. Shroff R., Arbel-Eden A., Pilch D. et al. Distribution and dynamics of chromatin modification induced by a defined DNA double-strand break // Curr. Biol. 2004. V. 14. P. 1703–1711.
  34. Bazzi M., Mantiero D., Trovesi C. et al. Dephosphorylation of  $\gamma$ H2A by Glc7/protein phosphatase 1 promotes recovery from inhibition of DNA replication // Mol. Cell. Biol. 2010. V. 30. P. 131–145.

## Pph3 Phosphatase Is Involved in the Regulation of the Error-Free Branch of Postreplicative DNA Repair in Yeast *Saccharomyces cerevisiae*

D. V. Fedorov<sup>a</sup>, T. A. Evstyukhina<sup>a</sup>, V. T. Peshekhonov<sup>a</sup>, and V. G. Korolev<sup>a</sup>, \*

<sup>a</sup>Petersburg Nuclear Physics Institute named by B.P. Konstantinov  
of National Research Centre "Kurchatov Institute," Gatchina, 188300 Russia

\*e-mail: korolev\_vg@pnpi.nrcki.ru

It has been shown that Pph3 phosphatase is involved in the dephosphorylation of the crucial checkpoint kinase Rad53 in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Pph3 protein forms a complex with a Psy2 subunit, which binds to Rad53 kinase and dephosphorylates it without the involvement of a third subunit. Triple complex consisting of Pph3, Psy2 and Psy4 subunits dephosphorylates  $\gamma$ H2A. Earlier, we have shown that the *HSM6* gene represents an allele of *PSY4* gene. The *hsm6-1* mutation increased the frequency of DNA repair spontaneous and UV-induced mutagenesis. In this study we showed that the deletion of *PPH3* gene increases the rate of spontaneous mutagenesis by a factor of seven in *S. cerevisiae*. At high UV light doses the frequencies of mutations in *pph3 $\Delta$* , *psy4 $\Delta$*  and *hsm6-1* mutant strains are equal and exceed the level of mutagenesis in the wild type strain approximately twofold. In case of reparative spontaneous mutagenesis, *pph3 $\Delta$*  and *hsm6-1* mutations show epistatic effect. All mutants exhibited higher (approximately 10-fold) frequency of  $\gamma$ -induced mutations in comparison with the wild type strain. The combination of mutations in the genes encoding the subunits of PPH3 and mutations in the *MMS2* and *XRS2* genes that control the error-free path of post-replicative repair leads to the blocking of PPH3-specific UV-induced mutagenesis. Our results indicate that *ptc2 $\Delta$  ptc3 $\Delta$*  double mutant don't influence UV-induced mutagenesis and survival. These data indicate that hyperphosphorylation only of Pph3 specific sites of the Rad53 increases the UV-induced mutagenesis. Thus, we identified the PPH3 complex as a new factor involved in the regulation of the error-free branch of postreplicative repair.

**Keywords:** Pph3 phosphatase, DNA repair, yeast, tolerance, error-free branch of repair, mutagenesis.