

P19-2007-126

Н. А. Колтовая¹, Ю. В. Никулушкина, Е. Ю. Кадышевская,
М. П. Рощина², А. Б. Девин²

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ЧЕКПОЙНТ-ГЕНОВ *RAD9*, *RAD17*,
RAD24, *RAD53* С ГЕНАМИ *SRM5/CDC28*, *SRM8/NET1*
И *SRM12/HFI1* В ОПРЕДЕЛЕНИИ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ
ДРОЖЖЕЙ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*
К ДЕЙСТВИЮ ИОНИЗИРУЮЩЕЙ РАДИАЦИИ

Направлено в журнал «Генетика»

¹E-mail: koltovaya@jinr.ru

²Институт молекулярной генетики Российской академии наук, Москва

Колтовая Н. А. и др.

P19-2007-126

Взаимодействие чекпойнт-генов *RAD9*, *RAD17*, *RAD24*, *RAD53* с генами *SRM5/CDC28*, *SRM8/NET1* и *SRM12/HFI1* в определении чувствительности дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* к действию ионизирующей радиации

Анализ радиочувствительности двойных мутантов показал, что гены регуляции в сверточной точке, или чекпойнт-гены, *RAD9*, *RAD17*, *RAD24*, *RAD53*, а также гены *SRM5/CDC28* и *SRM8/NET1* образуют одну эпистатическую группу у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, обозначенную нами как *RAD9*-группа. Использование мутаций *srm*, определяющих чувствительность к ионизирующей радиации, позволило выявить разветвленность *RAD9*-зависимого пути определения радиорезистентности клеток. Мутация *cdc28-srm* гипостатична по отношению к мутациям *rad9Δ*, *rad17Δ*, *rad24Δ* и аддитивна по отношению к *rad53*. Мутация *net1-srm* гипостатична по отношению к *rad9Δ* и *rad53*, но аддитивно усиливает эффекты мутаций *rad17Δ* и *rad24Δ*. Ген *SRM12/HFI1* не входит в *RAD9*-группу. Мутация гена *hfi1-srm* аддитивно усиливает эффект мутаций *rad24Δ* и *rad9Δ*. Изучаемые гены могут участвовать также в минорных механизмах радиорезистентности, относительно независимых от упомянутого *RAD9*-зависимого механизма.

Работа выполнена в Лаборатории радиационной биологии ОИЯИ.

Препринт Объединенного института ядерных исследований. Дубна, 2007

Koltovaya N. A. et al.

P19-2007-126

Interactions of Checkpoint-Genes *RAD9*, *RAD17*, *RAD24*, *RAD53* with Genes *SRM5/CDC28*, *SRM8/NET1* and *SRM12/HFI1* in Determining Radioresistance of Yeast *Saccharomyces Cerevisiae*

In yeast *Saccharomyces cerevisiae* checkpoint-genes *RAD9*, *RAD17*, *RAD24*, *RAD53* and genes *SRM5/CDC28*, *SRM8/NET1*, *SRM12/HFI1* have been found to belong to one epistasis group with the exception of *SRM12/HFI1* as regards cell sensitivity to gamma radiation. This group was named *RAD9*-group. Analysis of radiosensitivity of double mutants has revealed that mutation *cdc28-srm* is hypostatic to each of *rad9Δ*, *rad17Δ* and *rad24Δ*. Mutation *net1-srm* is hypostatic to *rad9Δ* and *rad53*, but additive to *rad17Δ* and *rad24Δ*. Mutation *hfi1-srm* has additive effect in compound with mutations *rad24Δ* and *rad9Δ*. So investigations of interactions mutations *rad* with mutations *srm* have demonstrated a branched of *RAD9*-dependent pathway of radioresistance. The studied genes can participate in a minor mechanism involved in determining the cell radiation sensitivity independently of mentioned *RAD9*-dependent pathway.

The investigation has been performed at the Laboratory of Radiation Biology, JINR.

Preprint of the Joint Institute for Nuclear Research. Dubna, 2007

Систематический анализ делеционных мутантов дрожжей [1] позволил пополнить перечень локусов, отвечающих за чувствительность дрожжей к γ -излучению [2]. Вместе с тем, те гены, которые опосредуют толерантность к повреждениям ДНК, внося существенный вклад в жизнеспособность клеток, могут быть пропущены при делеционном анализе. Поэтому применительно к данной проблеме сохраняет свое значение анализ мутаций, совместимых с жизнеспособностью (точковых), в частности, например, генных мутаций *srn*, вызывающих наряду с изменением митохондриальной *rho*⁻-мутабельности, изменения митотической стабильности хромосом и радиорезистентности [3–5]. Часть генов *SRM* была идентифицирована, а именно, генам *SRM5*, *SRM8*, *SRM12* соответствуют гены *CDC28*, *NET1* и *HFI1* [3, 4, 6, 7].

Поскольку ген циклин-зависимой киназы *CDC28* является жизненно важным, то влияние мутаций *cdc28* на чувствительность клеток к повреждающим агентам зависит от локализации мутации и степени функционального повреждения белка. Например, ранее было показано, что мутация *cdc28-1* не влияет на УФ-чувствительность [8], а мутация *cdc28-1N* влияет на чувствительность клеток дрожжей к УФ-свету [9]. Мутация *cdc28-1N* представляет собой замену [P250L], природа мутации *cdc28-1* неизвестна [10]. Выделенная нами мутация *cdc28-srn* [G16S] локализована в консервативной глицин-богатой петле [11], играющей важную роль в архитектуре белка, и имеет плейотропные проявления, в частности, влияет на радиорезистентность [6, 12–14]. В различных системах показано участие циклинов, регуляторных субъединиц киназы, в отклике на повреждения ДНК. Так, потеря S-циклинов Clb5 и Clb6 вызывает повышение чувствительности клеток к действию ММС, УФ-света и ионизирующей радиации [15]. Таким образом, имеющиеся данные убедительно свидетельствуют об участии киназы *CDC28* в определении уровня радиорезистентности.

Ген *NET1/SRM8* кодирует структурную субъединицу ядрышкового комплекса RENT, которая удерживает в ядрышке фосфатазу Cdc14 и деацетилазу Sir2 [16, 17]. Участие гена *NET1/SRM8* в радиорезистентности клеток показано нами впервые с помощью мутации сдвига рамки считывания *net1-srn* [4, 6, 7, 18]

Структурная субъединица Srm12/Ada1/Hfi1 входит в состав комплекса SAGA, обладающего гистон-ацетилтрансферазной активностью, за которую ответственна субъединица Gcn5 [19]. Участие гена *HFI1/SRM12* в радиорезистентности клеток показано нами впервые с помощью нонсенс-мутации

hfi1-srm [4, 6, 7, 18]. Ген *HFII* был идентифицирован в качестве гена радиочувствительности также в результате делеционного анализа [1].

В настоящей работе анализировали влияние парных сочетаний мутаций чекпойнт-генов и мутаций *srm* на чувствительность дрожжей к повреждающему действию ионизирующей радиации. Из полученных данных следует, что эпистатической группе, которую образуют гены *RAD9*, *RAD17*, *RAD24*, *RAD53*, *CDC28* и *NET1*, по-видимому, соответствует единый основной *RAD9*-зависимый механизм радиорезистентности *Saccharomyces cerevisiae*. Эпистатическую группу, в которую входит ген *HFII*, определить не удалось.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Штаммы Saccharomyces cerevisiae, использованные в работе (табл. 1), являются близкородственными и сконструированы введением перечисленных ниже мутаций в генотип изогенных родительских штаммов. Мутации вводили посредством скрещивания штаммов-источников с родительскими штаммами 71а или 71α [14], получения пологого потомства и неоднократных (не менее трех) последовательных бэкроссов с 71а или 71α. Мутанты *srm5/cdc28-srm* [3], *srm8/net1-srm* и *srm12/hfi1-srm* [4] получены авторами настоящей работы. В качестве источника мутаций *rad6-1* и *rad52-1* использовали штаммы из Центра генетических культур дрожжей в Беркли, США (ныне ATCC) JG-6 (*rad6-1*) и g160/2b (*rad52-1*). Источниками мутаций *rad9Δ*, *rad17Δ*, *rad24Δ* и *rad53* служили штаммы 7859-7-4а (*MATa rad9::LEU2 leu2-3,112 trp1-289 ura3-52 his7*), SX46A *rad24Δ* (*MATa rad24::URA3 ade2 his3-532 trp1-289 ura3-52*), SX46A *rad17Δ* (*MATa rad17::URA3 ade2 his3-532 trp1-289 ura3-52*) и CRY1 (*MATa sad1-1 (=rad53) ade2-1 ura3-1 trp1-1 his3-11,15 leu2-3,112 can1-100*). Первый из этих штаммов получен от проф. Л. Хартуэлла (Вашингтонский университет, Сиэтл), прочие предоставлены проф. У. Зиде (Техасский университет, Даллас).

Среды и реактивы. Использовали стандартную полную питательную среду YEPD [20] и среды БС, РМГ, SMK, описанные ранее [3].

Тетрадный анализ. Культуры диплоидных гибридов выращивали в течение суток на предспоруляционной среде РМГ и затем переносили на споруляционную среду SMK. Спустя 3–5 сут инкубации при комнатной температуре аскоспоры изолировали с помощью микроманипулятора на агаризованном блоке среды БС и инкубировали в течение 4 сут при 30° С.

γ-облучение. Водные суспензии ($10^3 - 10^5$ клеток/мл) семисуточных стационарных культур, выросших на агаризованной среде БС, облучали во льду на установке «Свет» (^{137}Cs , 25 Гр/мин) Объединенного института ядерных исследований (Дубна). В особо указанных случаях облучение проводили на

Таблица 1. Штаммы, использованные в работе

Штамм	Генотип	Источник или происхождение
7859-7-4a	<i>MATα rad9::LEU2 leu2-3,112 trp1-289 ura3-52 his7</i>	L.H.Hartwell (University of Washington, Seattle)
SX46A rad24Δ	<i>MATα rad24::URA3 ade2 his3-532 trp1-289 ura3-52</i>	W.Siede (University of Texas, Dallas)
SX46A rad17Δ	<i>MATα rad17::URA3 ade2 his3-532 trp1-289 ura3-52</i>	“
CRY1	<i>MATα rad53 (=sad1-1) ade2-1 ura3-1 trp1-1 his3-1,15 leu2-3,112 can1-100</i>	YGSC*
g160/2b	<i>MATα rad52-1 ade2-1 arg4 arg9 trp1 his5 lys1-1 iby3 leu pet</i>	“
JG-6	<i>MATα rad6-1</i>	“
71a	<i>MATα SRM+ ade1</i>	Сконструирован авторами [14,19]
71α	<i>MATα SRM+ ade1</i>	“
R8a	<i>MATα net1-srm (=srm8) ade2 trp1 ura3</i>	“
R8α	<i>MATα net1-srm ade2 trp1 ura3</i>	“
R12a	<i>MATα hfl1-srm (=srm12) ade2 trp1 ura3</i>	“
R12α	<i>MATα hfl1-srm ade2 trp1 ura3</i>	“
C50/1-C50/4	<i>MATα/MATα cdc28-srm/cdc28-srm ade1/ade1</i>	“
C40/1, C40/2	<i>MATα/MATα rad52-1/rad52-1 ade1/ade1 cyh2/+ leu1/+ ade6/+</i>	“
C54/1, C54/2	<i>MATα/MATα rad52-1/rad52-1 cdc28-srm/cdc28-srm cyh2/+ leu1/+ ade6/+ ade1/ade1</i>	“
C05/1-C05/3	<i>MATα/MATα cdc28-srm/cdc28-srm rad6-1/RAD6 ade1/ade1</i>	“
C60/1-C60/3	<i>MATα/MATα cdc28-srm/CDC28 rad6-1/rad6-1 ade1/ade1</i>	“
C56/1-C56/3	<i>MATα/MATα cdc28-srm/cdc28-srm rad6-1/rad6-1 ade1/ade1</i>	“
C59/1-C59/4	<i>MATα/MATα cdc28-srm/cdc28-srm rad9::LEU2 ade1/ade1 leu2-3,112/leu2-3,112</i>	“
C09/1-C09/4	<i>MATα/MATα rad9::LEU2/rad9::LEU2 ade1/ade1 leu2-3,112/leu2-3,112</i>	“
C05/4-C05/7	<i>MATα/MATα cdc28-srm/cdc28-srm ade1/ade1 leu2-3,112/leu2-3,112</i>	“
C00/5-C05/8	<i>MATα/MATα ade1/ade1 leu2-3,112/leu2-3,112</i>	“

Продолжение табл. 1

Штамм	Генотип	Происхождение штаммов
С3/1-С3/2	<i>MATα/MATα rad52-1/rad52-1 cdc28-srm/cdc28-srm rad53/rad53 ade2/ade2</i>	Сконструированы авторами в данной работе "
Серия 5/17:		
5/+ 17/+ (1-3)	<i>MATα/MATα CDC28/cdc28-srm RAD17/rad17::URA3</i>	"
5/5 17/+ (1-3)	<i>MATα/MATα cdc28-srm/cdc28-srm RAD17/rad17::URA3</i>	"
5/+ 17/17 (1-3)	<i>MATα/MATα CDC28/cdc28-srm rad17::URA3/rad17::URA3</i>	"
5/5 17/17 (1-3)	<i>MATα/MATα cdc28-srm/cdc28-srm rad17::URA3/rad17::URA3</i>	"
Серия 5/24:		
5/+ 24/+ (1-3)	<i>MATα/MATα CDC28/cdc28-srm RAD24/rad24::URA3</i>	"
5/5 24/+ (1-3)	<i>MATα/MATα cdc28-srm/cdc28-srm RAD24/rad24::URA3</i>	"
5/+ 24/24 (1-3)	<i>MATα/MATα CDC28/cdc28-srm rad24::URA3/rad24::URA3</i>	"
5/5 24/24 (1-3)	<i>MATα/MATα cdc28-srm/cdc28-srm rad24::URA3/rad24::URA3</i>	"
Серия 5/53:		
5/+ 53/+ (1-2)	<i>MATα/MATα CDC28/cdc28-srm RAD53/rad53</i>	"
5/5 53/+ (1,2)	<i>MATα/MATα cdc28-srm/cdc28-srm RAD53/rad53</i>	"
5/+ 53/53 (1,2,3)	<i>MATα/MATα CDC28/cdc28-srm rad53/rad53</i>	"
5/5 53/53 (1,2,3)	<i>MATα/MATα cdc28-srm/cdc28-srm rad53/rad53</i>	"
Серия 8/9:		
+8 +/9 (1-4)	<i>MATα/MATα NET1/net1-srm RAD9/rad9::URA3</i>	"
9/9 8/+ (1-4)	<i>MATα/MATα NET1/net1-srm rad9::URA3/rad9::URA3</i>	"
9/+ 8/8 (1-4)	<i>MATα/MATα net1-srm/net1-srm RAD9/rad9::URA3</i>	"
9/9 8/8 (1-4)	<i>MATα/MATα net1-srm/net1-srm rad9::URA3/rad9::URA3</i>	"

Продолжение табл. 1

Штамм	Генотип	Происхождение штаммов
Серия 8/17		
8/+ 17/+ (1-4)	<i>MATa/MATa NET1/net1-srm RAD17/rad17::URA3</i>	“
8/8 17/+ (1-4)	<i>MATa/MATa net1-srm/net1-srm RAD17/rad17::URA3</i>	“
8/+ 17/17 (1-4)	<i>MATa/MATa NET1/net1-srm rad17::URA3/rad17::URA3</i>	“
8/8 17/17 (1-4)	<i>MATa/MATa net1-srm/net1-srm rad17::URA3/rad17::URA3</i>	“
Серия 8/24:		
8/+ 24/+ (1-3)	<i>MATa/MATa NET1/net1-srm RAD24/rad24::URA3</i>	“
8/+ 24/24 (1-3)	<i>MATa/MATa NET1/net1-srm rad24::URA3/rad24::URA3</i>	“
8/8 24/+ (1-4)	<i>MATa/MATa net1-srm/net1-srm RAD24/rad24::URA3</i>	“
8/8 24/24 (1-3)	<i>MATa/MATa net1-srm/net1-srm rad24::URA3/rad24::URA3</i>	“
Серия 8/53:		
8/+ 53/(1-3)	<i>MATa/MATa NET1/net1-srm RAD53/rad53</i>	“
8/8 53/+ (1-3)	<i>MATa/MATa net1-srm/net1-srm RAD53/rad53</i>	“
8/+ 53/53 (1-3)	<i>MATa/MATa NET1/net1-srm rad53/rad53</i>	“
8/8 53/53 (1-3)	<i>MATa/MATa net1-srm /net1-srm rad53/rad53</i>	”
Серия 5/12:		
5/+ 12/+ (1-4)	<i>MATa/MATa CDC28/cdc28-srm HFI1/hfi1-srm</i>	“
5/5 12/+ (1-4)	<i>MATa/MATa cdc28-srm/cdc28-srm HFI1/hfi1-srm</i>	“
5/+ 12/12 (1-3)	<i>MATa/MATa CDC28/cdc28-srm hfi1-srm/hfi1-srm</i>	“
5/5 12/12 (1-4)	<i>MATa/MATa cdc28-srm/cdc28-srm hfi1-srm/hfi1-srm</i>	“
Серия 12/9:		
12/+ 9/+ (1,2)	<i>MATa/MATa HFI1/hfi1-srm RAD9/rad9::LEU2</i>	”
12/+ 9/9 (1)	<i>MATa/MATa HFI1/hfi1-srm rad9::LEU2/rad9::LEU2</i>	’
12/12 9/+ (1-4)	<i>MATa/MATa hfi1-srm/hfi1-srm RAD9/rad9::LEU2</i>	’
12/12 9/9 (1-4)	<i>MATa/MATa hfi1-srm/hfi1-srm rad9::LEU2/rad9::LEU2</i>	’

Продолжение табл. 1

Штамм	Генотип	Происхождение штаммов
Серия 12/24:		
12/+ 24/+ (1-4)	<i>MATα/MATα HF11/hfi1-srm RAD24/rad24::URA3</i>	“
12/12 24/+ (1-3)	<i>MATα/MATα hfi1-srm/hfi1-srm RAD24/rad24::URA3</i>	“
12/+ 24/24 (1-4)	<i>MATα/MATα HF11/hfi1-srm rad24::URA3/rad24::URA3</i>	“
12/12 24/24 (1-4)	<i>MATα/MATα hfi1-srm/hfi1-srm rad24::URA3/rad24::URA3</i>	“
Серия 12/53		
12/+ 53/+ (1,2)	<i>MATα/MATα HF11/hfi1-srm RAD53/rad53</i>	“
12/+ 53/53 (1)	<i>MATα/MATα HF11/hfi1-srm rad53/rad53</i>	“
12/12 53/+ (1-3)	<i>MATα/MATα hfi1-srm/hfi1-srm RAD53/rad53</i>	“
12/12 53/53 (1-3)	<i>MATα/MATα hfi1-srm/hfi1-srm rad53/rad53</i>	“

* Центр генетических культур дрожжей в Беркли, США (Yeast Genetic Stock Center, Berkeley, USA)

γ -установке «Материаловедческая» (^{60}Co , 180 Гр/мин) «Курчатовского института» ГУ Федерального научного центра (Москва). Контрольные и облученные суспензии рассеивали на чашки со средой БС из расчета 100 жизнеспособных клеток на чашку и инкубировали 5–7 сут при 30°C.

УФ-облучение. Ночные культуры дрожжей, выращенные в жидкой YEPD при 30°C, отмывали от среды, разводили в воде, наносили на поверхность агаризованной среды БС (100 жизнеспособных клеток на чашку) и облучали в темноте УФ-светом (мощность дозы 0,3 Дж/м² с). Облученные чашки помещали на сутки в металлический пенал во избежание фотореактивации и вместе с контрольными чашками инкубировали в течение 5–7 сут при 30°C.

Значения точек теоретической кривой, описывающей аддитивность эффектов мутаций радиочувствительности, вычисляли по формуле $lgS_{\text{add}} = lgS_1 + lgS_2 - lgS_{\text{wt}}$, где S_1 и S_2 — значения выживаемости одиночных мутантов и S_{wt} — выживаемость дикого типа соответственно.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Мутация *cdc28-srm* и *rad6*- и *rad52*-эпистатические группы мутаций чувствительности к ионизирующему излучению. Поскольку мутация *cdc28-srm* повышает чувствительность клеток к ионизирующей радиации [13], интересно было выяснить, к какой эпистатической группе генов радиочувствительности относится ген *SRM5/CDC28*. У *S. cerevisiae* чувствительность клеток к ионизирующей радиации опосредуют гены групп эпистаза *RAD52* и *RAD6*. Гены группы *RAD52* ответственны за репарацию основной доли γ -индуцированных повреждений ДНК, которая осуществляется за счет репарации двунитевых разрывов (ДНР) ДНК путем гомологичной рекомбинации (HR). Гены эпистатической группы *RAD6* ответственны за репликацию поврежденной ДНК в застрявших репликативных вилках и пострепликативную репарацию меньшей, хотя и существенной, части летальных повреждений ДНК.

Предварительные результаты анализа радиочувствительности близкородственных диплоидных штаммов, одиночных и двойных мутантов, гомозиготных по мутациям *cdc28-srm*, *rad6-1* и *rad52-1*, уже были приведены в ранних публикациях [6, 13, 14, 21], в данной работе даются более полные результаты. На рис. 1 представлены усредненные кривые выживания для серий немутантных штаммов *CDC28/CDC28 RAD6/rad6-1*, *CDC28/CDC28 RAD52/RAD52*, одиночных мутантов *cdc28-srm/CDC28 rad6-1/rad6-1*, *cdc28-srm/cdc28-srm rad6-1/RAD6*, *CDC28/CDC28 rad52-1/rad52-1*, *cdc28-srm/cdc28-srm RAD52/RAD52* и двойных мутантов *cdc28-srm/cdc28-srm rad52-1/rad52-1*, *cdc28-srm/cdc28-srm rad6-1/rad6-1* (по 2–4 штамма в каждой серии). Двойные мутанты более чувствительны к γ -лучам, чем любой из одиночных мутантов. Ско-

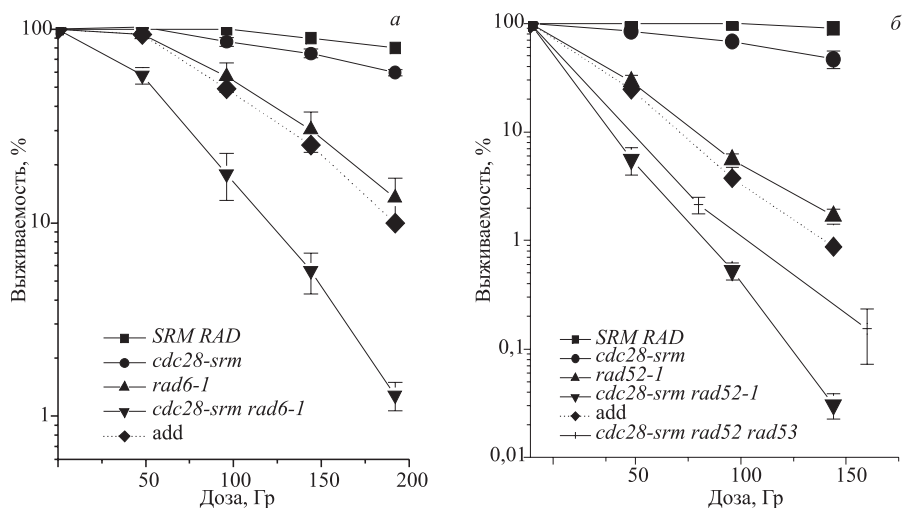


Рис. 1. Кривые выживания после γ -облучения диплоидных штаммов: одиночных и двойных мутантов, гомозиготных по мутациям *cdc28-srm* и *rad6-1* (а), одиночных (*cdc28-srm*, *rad52*), двойных (*rad52 cdc28-srm*) и тройных (*rad52 rad53 cdc28-srm*) мутантов (б). Каждая кривая соответствует усредненным данным для 4 штаммов (а) и для 1–3 штаммов (б) одинакового генотипа; показаны среднеквадратичные ошибки. Для сравнения дана кривая, ожидаемая при аддитивности влияния двух мутаций на радиочувствительность клеток

рее всего, действие пар мутаций *cdc28-srm*, *rad6-1* и *cdc28-srm*, *rad52-1* на γ -чувствительность у двойных мутантов имеет синергический характер. Таким образом, мутацию *cdc28-srm* нельзя отнести к группам эпистаза *RAD6* или *RAD52*. Влияние этой мутации на радиочувствительность, по-видимому, не сводится к специфическому нарушению одного из соответствующих двух путей репарации.

Анализ изменений радиочувствительности клеток при взаимодействии мутации *cdc28-srm* с мутациями *rad9* Δ , *rad17* Δ , *rad24* Δ , *rad53*. Известно, что в определении уровня радиочувствительности клеток помимо репарации важную роль играет чекпойнт-контроль, обеспечивающий остановку клеточного цикла, достаточную для репарации повреждений ДНК. Изучение взаимодействия гена *CDC28* с чекпойнт-генами в определении радиочувствительности представляет несомненный интерес.

Существенная роль в формировании отклика клетки на повреждение ДНК принадлежит чекпойнт-гену *RAD9*. Для изучения взаимодействия генов *CDC28* и *RAD9* мы использовали разрушенный аллель *rad9::LEU2* и мутацию

cdc28-srm. Были сконструированы следующие диплоидные штаммы (по 3–4 штамма одинакового генотипа): *cdc28-srm/cdc28-srm rad9::LEU2/rad9::LEU2*, *CDC28/CDC28 rad9::LEU2/rad9::LEU2*, *cdc28-srm/cdc28-srm RAD9/RAD9*, *RAD9/RAD9 CDC28/CDC28*. На рис. 2, *a* представлены кривые выживания этих мутантов. Они свидетельствуют об эпистатическом взаимодействии между изучаемыми мутациями: двойной мутант *rad9Δ cdc28-srm* не более чувствителен к γ -излучению, чем наиболее чувствительный из одиночных мутантов — *rad9Δ*. Таким образом, мутации генов *CDC28* и *RAD9* относятся к одной эпистатической группе, определяющей радиочувствительность клеток к γ -излучению.

Для анализа взаимодействия гена *CDC28* с чекпойнт-генами *RAD17*, *RAD24* и *RAD53* были сконструированы штаммы, несущие одиночные и двойные мутации. Как и ранее, чувствительность клеток к γ -излучению определяли в сериях близкородственных штаммов (табл. 1). На рис. 2, *б, в* приведены кривые выживания после γ -облучения диплоидных, стационарных культур. Двойные мутанты *cdc28-srm rad17Δ* проявляют радиочувствительность, близкую к радиочувствительности, ожидаемой при аддитивном эффекте (рис. 2, *б*). Двойные мутанты *cdc28-srm rad24Δ* проявляют ту же радиочувствительность, что и наиболее чувствительный из одиночных мутантов *rad24Δ/rad24Δ* (рис. 2, *в*). Таким образом, мутация *rad24Δ* эпистатична мутации *cdc28-srm*, а мутация *rad17Δ* аддитивна мутации *cdc28-srm*.

Для анализа взаимодействия гена *CDC28* с чекпойнт-геном *RAD53* были сконструированы соответствующие штаммы, несущие одиночные и двойные мутации. Двойные мутанты *cdc28-srm rad53* проявляют радиочувствительность, близкую к радиочувствительности, ожидаемой при аддитивном эффекте (рис. 2, *г*). Таким образом, мутация *rad53* аддитивна мутации *cdc28-srm*, т. е. протеинкиназы *CDC28* и *RAD53* контролируют разные пути, определяющие радиорезистентность клеток.

Поскольку пара генов *CDC28* и *RAD52* также контролирует различные пути, то представлял интерес анализ тройных мутантов. Тройные мутанты *rad52-1 rad53 cdc28-srm* были сконструированы, для трех клонов независимого происхождения определили радиочувствительность, облучая клетки на установке «Материаловедческая». Из рис. 1 видно, что тройной мутант не более чувствителен, чем двойной мутант *rad52-1 cdc28-srm*. Хотя анализ двойных мутантов *rad52-1 rad53* мы не проводили, но анализ радиочувствительности диплоидных двойных мутантов *rad52-1 rad53-1* в стационарной фазе роста, проведенный Лоуренсом [22], показал, что радиочувствительность двойного мутанта *rad52-1 rad53-1* совпадает с радиочувствительностью одиночного мутанта *rad52-1*. Таким образом, гены *RAD52* и *RAD53* относятся к одной эпистатической группе генов радиочувствительности. Можно предположить, что гены *CDC28* и *RAD52/RAD53* образуют две независимые ветви, определяющие чувствительность к γ -излучению.

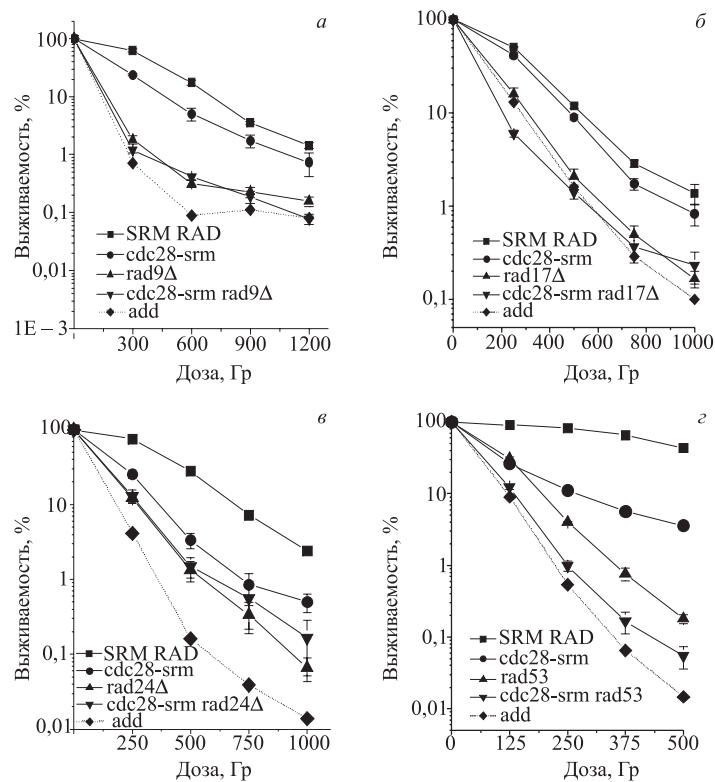


Рис. 2. Кривые выживания после γ -облучения диплоидных одиночных и двойных мутантов, гомозиготных по мутациям *cdc28-srm* и *rad9* (а), *cdc28-srm* и *rad17* (б), *cdc28-srm* и *rad9* (а), *cdc28-srm* и *rad24* (в), *cdc28-srm* и *rad53* (г). Каждая кривая соответствует усредненным данным для четырех или трех штаммов одинакового генотипа; показаны среднеквадратичные ошибки. Для сравнения дана кривая, ожидаемая при аддитивности влияния двух мутаций на радиочувствительность клеток

Анализ изменений радиочувствительности клеток при взаимодействии мутации *net1-srm* с мутациями *rad9 Δ , *rad17 Δ , *rad24 Δ и *rad53*.*** Для каждого из четырех попарных сочетаний *net1-srm* с мутациями *rad* чекпойнт-генов были сконструированы серии соответствующих одиночных и двойных мутантов, а также немутантных штаммов (см. табл. 1). Кривые выживаемости, представленные на рис. 3, а показывают, что радиочувствительность двойных мутантов *net1-srm rad9 Δ совпадает с радиочувствительностью одиночных мутантов. Функции генов *SRM8/NET1* и *RAD9*, по-видимому, относятся к одной и той же последовательности функций, участвующих в определении радиорезистентности клеток.*

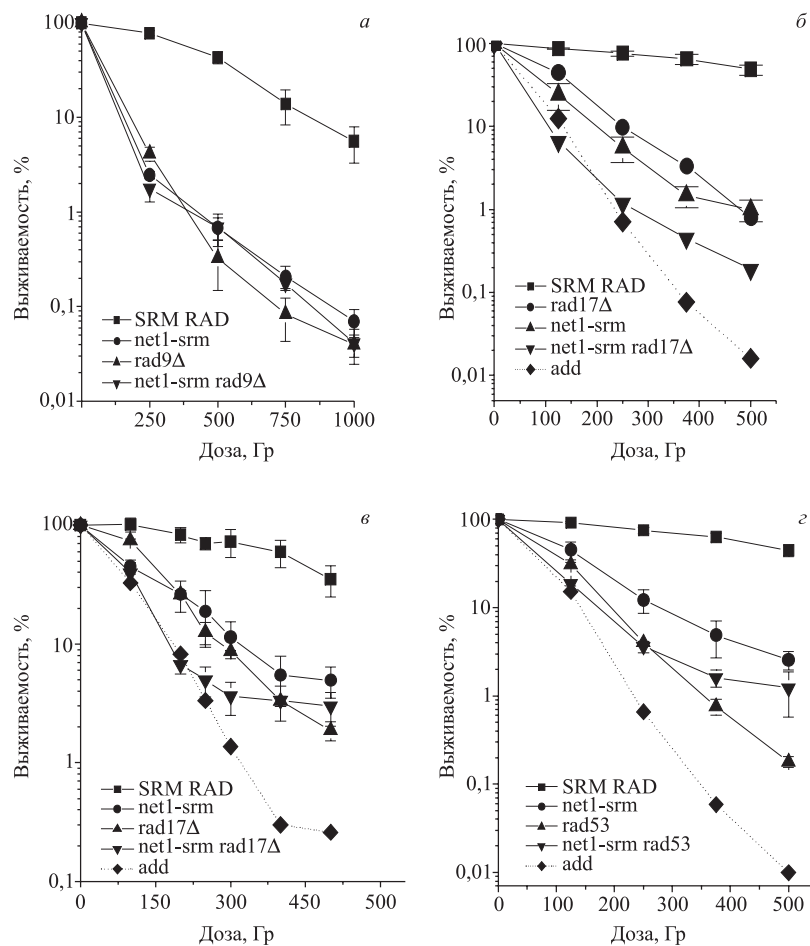


Рис. 3. Взаимодействие мутации *srm8/net1-srm* с мутациями *rad9Δ* (а), *rad17Δ* (б), *rad24Δ* (в), *rad53* (г). Каждая кривая соответствует усредненным данным для четырех штаммов одинакового генотипа; показаны среднеквадратичные ошибки. Для сравнения дана кривая, ожидаемая при аддитивности влияния двух мутаций на радиочувствительность клеток

Данные, представленные на рис.3,б, показывают, что на линейном участке кривой радиочувствительность у двойных мутантов *net1-srm rad17Δ* выше, нежели у одиночных мутантов и совпадает с расчетной кривой аддитивности. Следовательно, функции пары генов *SRM8/NET1* и *RAD17* не могут быть отнесены к одной и той же неразветвленной последовательности функ-

ций, участвующих в определении радиорезистентности клеток. На основании данных, представленных на рис. 3, в, аналогичный вывод можно сделать и относительно пары функций, определяемых генами *SRM8/NET1* и *RAD24*.

На рис. 3, г представлены кривые выживаемости серий одиночных и двойных мутантов по генам *NET1* и *RAD53*, а также немутантных штаммов. При больших дозах кривая радиочувствительности двойных мутантов описывает, главным образом, поведение почкующихся клеток, для которых характерна повышенная радиорезистентность [23]. Для корректности при анализе следует сопоставлять начальные участки кривых выживания. При малых дозах радиочувствительность двойных мутантов *net1-srm rad53* выше радиочувствительности одиночных мутантов и совпадает с расчетной кривой аддитивности. Следовательно, функция *RAD53* выпадает из той неразветвленной последовательности, к которой относятся функции генов *SRM8/NET1* и *RAD9*. Хотя для почкующихся клеток кривые радиочувствительности сближаются, но говорить об эпистазе мутаций *net1-srm* и *rad53* в отношении радиочувствительности нельзя, поскольку доля почкующихся клеток для каждой культуры не определялась.

Анализ взаимодействия мутаций *net1-srm* и *cdc28-srm* в отношении радиочувствительности двойных мутантов невозможен, поскольку двойные мутанты *cdc28-srm net1-srm* нежизнеспособны [4].

Анализ изменений радиочувствительности клеток при взаимодействии мутации *hfi1-srm* с мутациями *rad9Δ*, *rad24Δ* и *cdc28-srm*. Для изучения эффектов попарных сочетаний *hfi1-srm* с мутациями чекпойнт-генов и мутацией *cdc28-srm* сконструировали серии соответствующих одиночных и двойных мутантов, а также немутантных штаммов (см. табл. 1). Мутация *hfi1-srm* в отдельности вызывает лишь относительно небольшое изменение чувствительности клеток к γ -излучению и способна ревертировать. Кривые выживаемости, представленные на рис. 4, не позволяют однозначно оценить характер взаимодействия мутации *hfi1-srm* с мутациями *rad9 Δ* и *rad24 Δ*. На малых дозах до 300 Гр наблюдается аддитивность эффектов мутаций в указанных парах, при повышении дозы эта аддитивность исчезает (возможно, вследствие увеличения доли резистентных почкующихся клеток).

Двойные мутанты *hfi1-srm rad53* и *hfi1-srm net1-srm* [4] практически нежизнеспособны. В отличие от них клетки *hfi1-srm cdc28-srm* сохраняют жизнеспособность. Кривые выживаемости, показанные на рис. 4, а, свидетельствуют об аддитивности эффектов мутаций *hfi1-srm* и *cdc28-srm*, вызывающих изменения радиочувствительности клеток. В итоге нам не удалось с уверенностью установить, к какой неразветвленной последовательности функций, определяющих радиочувствительность дрожжей, можно отнести функцию гена *HF11*.

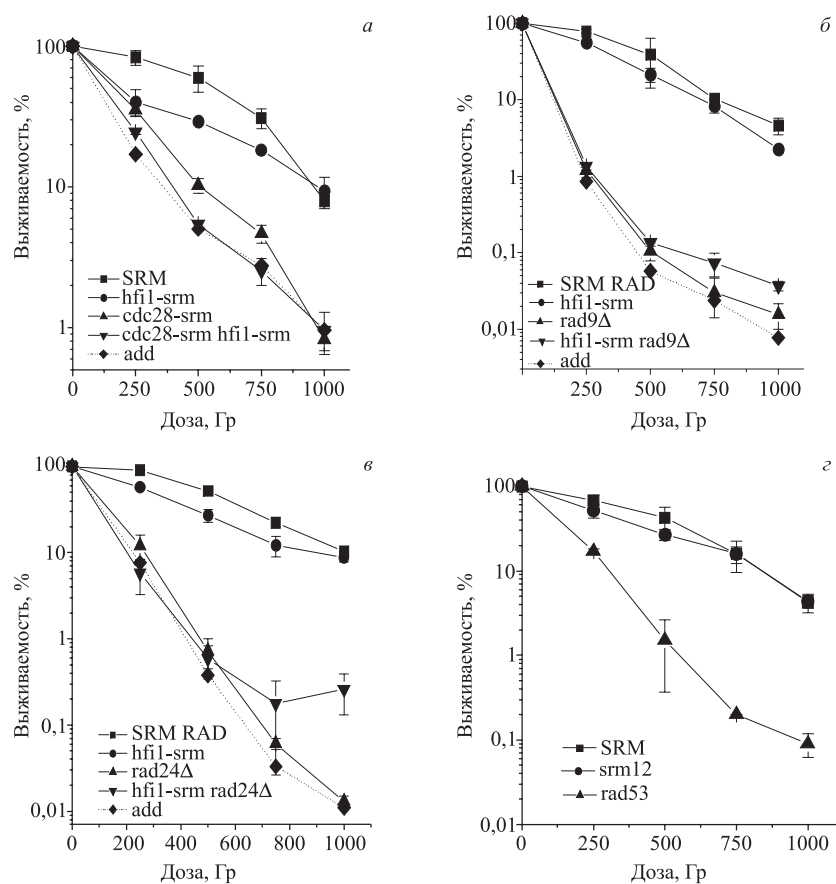


Рис. 4. Взаимодействие мутации *srm12/hfi1-srm* с мутациями *srm5/cdc28-srm* (а), *rad9Δ* (б), *rad24Δ* (в), *rad53* (г). Каждая кривая соответствует усредненным данным для трех-четырех штаммов одинакового генотипа; показаны среднеквадратичные ошибки. Для сравнения дана кривая, ожидаемая при аддитивности влияния двух мутаций на радиочувствительность клеток

ОБСУЖДЕНИЕ

Генетическому контролю чувствительности дрожжей к ионизирующей радиации посвящены многочисленные исследования [2]. Определены эпистатические группы генов, соответствующие различным путям репарации двуниевых разрывов ДНК (ДНР ДНК). Выделена большая группа генов, контролирующая остановку клеточного цикла при повреждении ДНК и увеличивающая емкость репарации [24]. Результаты исследования чекпойнт-генов

RAD9, *RAD17*, *RAD24* и *RAD53* позволяют отнести эти гены к одной и той же эпистатической группе, которой можно поставить в соответствие *RAD9*-зависимый путь определения радиорезистентности [25]. Однако идентификация генов радиорезистентности не завершена [1, 26]. В частности, в качестве генов радиорезистентности нами впервые были идентифицированы гены *CDC28/SRM5*, *NET1/SRM8* и *HFI1/SRM12* [6, 21]. В данной работе исследованы эффекты, вызываемые сочетанием мутаций в этих генах с мутациями других генов радиорезистентности.

Анализ эпистатических взаимодействий между мутациями показал, что мутация *rad9Δ* эпистатична по отношению к мутациям *cdc28-srm* и *net1-srm*. В то же время эффекты мутации *srm* и, по меньшей мере, одной из мутаций *rad17Δ*, *rad24Δ* и *rad53* (в сочетаниях *cdc28-srm* и *rad53*; *cdc28-srm* и *rad17Δ*; *net1-srm* и *rad17Δ*; *net1-srm* и *rad24Δ*; *net1-srm* и *rad53*; *hfi1-srm* и *rad9Δ*; *hfi1-srm* и *rad24Δ*; *hfi1-srm* и *cdc28-srm*) обнаруживают аддитивность (табл. 2). Таким образом, все проанализированные гены, кроме *HFI1*, относятся к одной эпистатической *RAD9*-группе генов, однако анализ эффектов мутаций *srm* выявил разветвленность *RAD9*-зависимого пути определения радиорезистентности дрожжей, в частности гены *RAD9* и *RAD24* относятся к одной ветви, а киназы *RAD53* и *CDC28* относятся к разным ветвям *RAD9*-зависимого пути определения радиорезистентности дрожжей.

Таблица 2. Эпистатические взаимодействия между чекпойнт-генами при γ -облучении

	<i>RAD9</i>	<i>RAD17</i>	<i>RAD24</i>	<i>RAD53</i>	<i>CDC28</i>	<i>RAD6</i>	<i>RAD52</i>
<i>RAD9</i>	Е						
<i>RAD17</i>	О	Е					
<i>RAD24</i>	О	О	Е				
<i>RAD53</i>	Е	Е	Е	Е			
<i>CDC28</i>	Е	А	Е	А	Е	С	С
<i>RAD6</i>	Е	А	А	А	L	Е	—
<i>RAD52</i>	А	—	А	L	А	—	Е

Примечание: Е — эпистаз; А — аддитивность;
О — эпистаз, но действуют в противоположных направлениях;
С — синергизм; L — синтетическая леталь; — нет данных

Ген CDC28. Полученные нами данные указывают на участие киназы *CDC28* в межхромосомной рекомбинации. Для мутантов, у которых специфически нарушена межхромосомная рекомбинация, характерно существенное повышение чувствительности к ионизирующей радиации у диплоидов, тогда как для гаплоидных мутантных клеток характерно лишь относительно небольшое повышение радиочувствительности. Например, вышеописанные свойства характерны для геликазы *Srs2* [27, 28], активация которой зависит от киназы

CDC28 [29]. Мутация *cdc28-srm* также слабо повышает радиочувствительность гаплоидных клеток и существенно влияет на радиочувствительность диплоидных клеток в стационарной фазе. Кроме того, обнаружено влияние на частоту спонтанной и индуцированной митотической рекомбинации [14]. Уровень спонтанной генной конверсии у мутанта *cdc28-srm* увеличен в 10 раз по сравнению с клетками дикого типа, а частота индуцированной митотической рекомбинации в клетках этого мутанта подавлена, при этом снижается как частота генной конверсии, так и кроссинговера.

В данной работе показано, что ген *CDC28* не относится к группам эпистаза *RAD6* и *RAD52*, опосредующим репарацию основной части радиационных повреждений ДНК путем пострепликативной репарации и гомологичной рекомбинации (HR). Мутационные нарушения минорных путей репарации ДНР ДНК, например NHEJ, практически не изменяют чувствительность к ионизирующим излучениям у клеток *RAD52* с компетентной HR, но дают вполне заметный эффект у мутантных клеток *rad52* [30, 31]. Радиочувствительность этих двойных мутантов, например клеток *sir2 rad52* [32], близка к таковой двойных мутантов *cdc28-srm rad52*. Можно предположить, что ген *CDC28* регулирует также минорный путь (пути) репарации.

Однако влияние на радиочувствительность двойных мутантов *cdc28-srm rad52*, возможно, связано с участием гена *CDC28* в чекпойнт-контроле [33]. Мутации в чекпойнт-генах *RAD9*, *RAD17* и *RAD24* эпистатичны по отношению к мутации *cdc28-srm*. Таким образом, выявляется потенциальная причастность гена *CDC28* к действию чекпойнт-контроля повреждений ДНК. Аддитивность эффектов *cdc28-srm* и *rad53* в этом случае свидетельствует о разветвленности последовательности функций, необходимых для чекпойнт-контроля. Однако введение дополнительной мутации *rad53* в генотип двойного мутанта *cdc28-srm rad52* не приводит к дополнительному увеличению γ -чувствительности. Вместе с тем, мутация *rad53* снижает эффективность NHEJ [34] и в отличие от мутаций *rad9 Δ* , *rad24 Δ* и *rad17 Δ* эффективность HR [35]. Возможно, именно в этом состоит причина аддитивности эффектов *rad53* и *cdc28-srm*.

Полученные нами результаты о роли гена *CDC28* в репарации и чекпойнт-контроле согласуются с данными других авторов [36]. Киназная активность *CDC28* необходима для обеспечения протяженной деградации концов единичного ДНР, осуществляемой комплексом MRX (*MRE11/RAD59/XRS2*), и для активации чекпойнт-контроля ДНР ДНК. Показано функциональное взаимодействие между киназой *Cdc28/C1b2* и комплексом MRX в ходе смены фаз клеточного цикла, рекомбинации и репарации [37, 38]. Хотя некоторые белки, участвующие в рекомбинации ДНК (в том числе *Mre11p*, *Rad50p* и *Srs2p*), являются субстратами циклин-зависимой киназы *CDC28* [29, 39], но функциональная значимость фосфорилирования пока не выявлена. В необлученных клетках белок *Mre11* образует комплекс с геликазами *Srs2* и

Sgs1. При облучении происходит индуцибельное CDC28-зависимое фосфорилирование геликазы Srs2 и Mec1p-зависимое образование отдельных комплексов Sgs1p-Mre11p и Srs2p-Mre11p [40]. Белок Mre11, обладающий ДНК-нуклеазной и ДНК-геликазной активностями, потенциально может быть фосфорилирован киназой CDC28 по нескольким сайтам. Однако было показано, что мутации в этих сайтах не влияют на активацию чекпойнт-контроля и, по-видимому, на деградацию концов разрыва [36].

У гаплоидных клеток, находящихся в фазе G1 клеточного цикла, активность протеинкиназы CDC28 низка и вследствие этого низка также процессивная активность комплекса MRX [36]. В этих условиях ДНР ДНК стимулируют репарацию по механизму NHEJ. Для клеток, находящихся в фазе G2 клеточного цикла, характерна высокая активность протеинкиназы CDC28 и эффективная деградация концов разрывов. В таких условиях возможна репарация ДНР ДНК по механизму HR. Таким образом, для репарации путем HR, помимо наличия гомолога, существенна и активность киназы CDC28 [36, 38]. Кроме того, не исключено участие CDC28 в других типах репарации, например в минорном пути репарации BIR. Показано дигибридное взаимодействие между Clb2 и белком Mus81p, принимающим участие в BIR-репарации [41].

Для HR киназная активность CDC28 необходима на всех стадиях клеточного цикла [36]. Активность Cdc28/Clb2 контролирует две ветви пути RAD52-зависимой HR — RAD50-зависимую и RAD51-зависимую ветви [37]. Следует отметить, что HR не подавлена полностью в G1-арестованных или Cdc28-ингибированных клетках, в которых наблюдается остаточная деградация концов ДНР ДНК, возможно, Cdc28-независимой экзонуклеазой. Однако известно, что в клетках, облученных УФ-светом в фазе G1, индуцированное облучением фосфорилирование киназы Rad53 зависит от киназной активности Cdc28/Clb2 [42]. Соответственно, при определении чувствительности клеток к УФ-свету мутации *cdc28* и *rad53* должны быть эпистатичны по отношению друг к другу. В проведенных нами экспериментах при γ -облучении мы обнаружили аддитивность эффектов этих мутаций, указывающую на дополнительное, RAD53-независимое участие CDC28 в регулировании процессов, определяющих пострадиационную выживаемость клеток. Причем клетки *cdc28-srm rad53* более чувствительны к γ -излучению, нежели соответствующие одиночные мутанты и двойные мутанты *rad9 Δ cdc28-srm* и *rad9 Δ rad53*. По-видимому, в определении радиорезистентности дрожжей играет заметную роль RAD9-независимый регуляторный механизм, который опосредуют гены CDC28 и RAD53. При одновременном повреждении указанных двух генов данный механизм радиорезистентности, очевидно, инактивируется.

Гены NET1, HF11. Влияние ядрышкового белка Net1 на радиочувствительность может быть опосредовано участием в регуляции локализации деацетилазы Sir2. Деацетилаза Sir2 принимает участие в процессах, влияющих на радиочувствительность клеток, а именно в сайленсинге локусов, определя-

ющих пол клетки [44, 45], и в деацетилировании гистонов [43]. В диплоидных клетках, экспрессирующих оба аллеля локуса типа спаривания, *MATa* и *MATα*, по сравнению с гаплоидами, экспрессирующими лишь *MATa* или *MATα*, снижен уровень репарации путем негомологичной рекомбинации NHEJ [44–46]. Разрушение генов *SIR2*, *SIR3* и *SIR4*, участвующих в транскрипционном сайленсинге генов, снижает эффективность NHEJ у гаплоидов [32] в основном вследствие дерепрессии и одновременной экспрессии локусов *HMLa* и *HMLα* [44, 45]. Нарушение распределения белков сайленсинга в диплоидных клетках мутанта *net1-srm*, возможно, и может привести к изменению эффективности NHEJ за счет снижения экспрессии локусов *MAT*, но это приведет скорее к повышению эффективности NHEJ. В нашем случае повышение радиочувствительности у мутантов *net1-srm*, по-видимому, связано не с сайленсингом локусов типа спаривания *MAT*, а с модификацией, деацетилированием, гистонов и/или иных белков в сайте разрыва ДНК.

Активация репарации ДНК и чекпойнт-регуляция клеточного цикла сопряжены с изменениями структуры хроматина, которые связаны, в частности, с химической модификацией гистонов. В процессе HR к ДНР стягиваются гистон-ацетилтрансферазы Gcn5 и Esa1, входящие в соответствующие комплексы SAGA и NuA4 и осуществляющие ацетилирование гистонов H3 и H4 [43]. Делеция по N-концевому участку гистона H3 вызывает более выраженное по сравнению с нарушением гистона H4-tailΔ повышение чувствительности при индукции ДНР [43]. Ацетилирование N-хвостов гистонов H4 необходимо для осуществления минорных путей репарации ДНК — NHEJ и VHR [47]. Мутации, затрагивающие ацетилируемые остатки лизина в положениях 14 и 23 аминокислотной последовательности гистона H3 [48], и мутация гистон-ацетилтрансферазы *gcn5* [49] вызывают повышение чувствительности клеток к агентам, индуцирующим ДНР ДНК. Мутация *hfl1-srm* структурной субъединицы SAGA-комплекса Adal/Hfl1 также повышает чувствительность к ионизирующей радиации [6, 4]. Для клеток человека показано взаимодействие ацетилтрансферазы *hGCN5* с белком Ku70 [50], который в процессе NHEJ в виде гетеродимера совместно с белком Ku80 регулирует связывание ДНК-зависимой протеинкиназы с ДНК.

В процессе HR к ДНР стягиваются также деацетилазы Rpd3, Hst1 и Sir2, осуществляющие деацетилирование N-хвостов гистонов H4 и H3 [43]. Таким образом, белок Sir2 изменяет радиорезистентность и другими способами, помимо α/α -эффекта. Мутация *net1-srm* субъединицы RENT-комплекса, регулирующего локализацию деацетилазы Sir2 в ядрышке, влияет на радиочувствительность [4].

В клетках человека показано опосредованное модификацией белка p53 участие ацетилирования НАТ-комплексом STAGA (компоненты *hADA3* и *hGCN5*) и NAD-зависимого деацетилирования гистонов Sir2 α в апоптозе и определении уровня радиорезистентности [51–57].

В данной работе показано, что в отношении радиорезистентности ген *NET1/SRM8* взаимодействует эпистатически с геном *RAD9*, но аддитивно с генами *RAD17*, *RAD24*, *RAD53*. Ген *HFI1/SRM12* взаимодействует аддитивно с генами *RAD9* и *RAD24*. По-видимому, ген *NET1/SRM8* функционирует на одном пути с геном *RAD9*, отличном от *RAD24*-зависимого пути, а *HFI1/SRM12*-путь отличен от *RAD9*- и *RAD24*-зависимых путей. Генетические данные свидетельствуют о взаимодействии генов *CDC28*, *NET1* и *HFI1/ADA1*. Двойные мутанты *cdc28-srm net1-srm* и *net1-srm hfi1-srm* нежизнеспособны [4]. Мутации *hfi1-srm* и *cdc28-srm* имеют аддитивный эффект при γ -облучении.

Схема путей, контролирующей чувствительность к ионизирующей радиации. Полученные данные детализируют наше предположение о том, что гены *SRM* находятся на верхних ступенях иерархии генетической регуляции у дрожжей [14]. Гены *SRM* регулируют не только прохождение фаз цикла клеточного деления, но и механизмы устранения повреждений ДНК. По-видимому, *RAD9*-зависимый механизм определения радиорезистентности дрожжей, регулирующий, главным образом, смену фаз клеточного цикла при наличии повреждения ДНК, сам тоже подчиняется регуляции и схематически представим в виде разветвленной структуры, у которой отдельные *CDC28*- и *NET1*-зависимые ветви сходятся на *RAD9*-зависимом стволе, а ген *HFI1* образует отдельную ветвь. Схема взаимодействия генов изображена на рис. 5. Ген *RAD53* в упомянутой иерархии позиционируется ниже генов *SRM* на отдельной *RAD24*-зависимой ветви. Можно предположить, что выбор белкового комплекса, загружаемого в месте разрыва ДНК, зависит от компактизации ДНК и типа повреждения. Белок Net1 необходим для активации белка Rad9, а именно, модификации гистонов деацетилазой Sir2, но не гистон-ацетилтрансферазой Gcn5 необходимы для связывания с ДНР ДНК белка Rad9, но не нужен для посадки комплекса Rad24-RFC. Причем белки Net1 и Hfi1 функционируют независимо от киназы CDC28.

Остаются загадочными взаимодействия мутации *cdc28-srm* с мутациями *rad17 Δ* и *rad24 Δ* . Предполагается, что комплекс Rad17-Mec3-Ddc1 загружается на ДНР ДНК с помощью комплекса Rad24-Rfc1-5 [58]. По нашим данным мутация *rad24 Δ* эпистатична мутации *cdc28-srm*, а мутация *rad17 Δ* аддитивна мутации *cdc28-srm*. Эти данные предполагают, что Rad17-комплекс принимает участие в каком-то *CDC28*-независимом процессе. Показано, что существует, по крайней мере, два RFC-подобных комплекса — Rad24-RFC и Chl12/Ctf18-RFC, — которые принимают участие в чекпойнт-регуляции при блоке репликации [59]. Возможно, эти комплексы контролируют две ветви, одна из которых *CDC28*-независимая. Ранее нами было показано, что киназа *CDC28* не влияет на чекпойнт-контроль при блоке репликации [60]. Отметим, что Rad9p не единственный белок-активатор киназы Rad53. В ответ на блок репликации активацию киназы Rad53 опосредует белок Mrc1. Аддитивное взаимодействие мутаций генов *RAD24* и *RAD53* в отношении действия

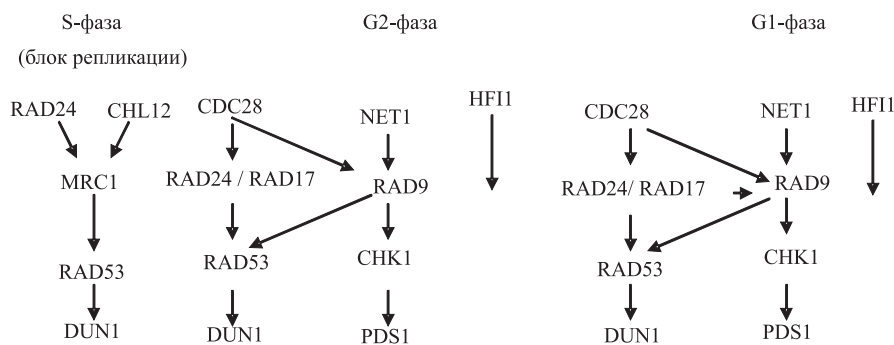


Рис. 5. Схема взаимодействия генов в регуляции радиочувствительности клеток дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Описание см. в тексте

УФ-лучей и эпистатичное при γ -облучении также не вписывается в схему. Предложенная схема нуждается в проверке и включении в анализ дополнительных генов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Bennett C. B., Lewis L. K., Karthikeyan G., Lobachev K. S., Jin Y. H., Sterling J. F., Snipe J. R., Resnick M. A. Genes required for ionizing radiation resistance in yeast // *Nature Genet.* 2001. V. 29. P. 426–434.
2. Game J. C. The *Saccharomyces* repair genes at the end of the century // *Mutation Res.* 2000. V. 451. P. 277–293.
3. Devin A. B., Prosvirova T. Yu., Peshekhonov V. T., Chepurnaya O. V., Smirnova M. Ye., Koltovaya N. A., Troitskaya E. N., Arman I. P. The Start gene *CDC28* and the genetic stability of yeast // *Yeast.* 1990. V. 6. P. 231–243.
4. Koltovaya N. A., Guerasimova A. S., Tchekhouta I. A., Devin A. B. *NET1* and *HFI1* genes of yeast mediate both chromosome maintenance and mitochondrial rho⁻-mutagenesis // *Yeast.* 2003. V. 20. P. 955–971.
5. Девин А. Б., Колтовая Н. А., Гаврилов Б. В., Арман И. П. Получение и характеристика новых ядерных генных мутаций *srm*, вызывающих координированные изменения поддержания ядерных и митохондриальных генетических структур у дрожжей сахаромисетов // *Генетика.* 1994. Т. 30. С. 1194–1201.
6. Колтовая Н. А., Карвига Т. Д., Любимова К. А., Майорова Е. С., Арман И. П., Девин А. Б. Радиочувствительность дрожжей сахаромисетов и гены *SRM*: эффекты мутаций *srm1* и *srm5* // *Генетика.* 1998. Т. 34. С. 610–624.

7. Колтовая Н.А., Майорова Е.С., Рзянина А.В., Герасимова А.С., Девин А.Б. Новые мутации генов *SRM Saccharomyces cerevisiae* и некоторые особенности их фенотипического проявления // Генетика. 2001. Т. 37. С. 1213–1224.
8. Baranowska H., Swietlinska Z., Zaborowska D., Zuk J. *Cdc* and *pvt* mutants of *Saccharomyces cerevisiae* with increased sensitivity to diepoxybutane and ultraviolet // Acta Microbiol. Pol. Safetyn. 1982. V. 31. P. 119–128.
9. Ostroff R.M., Sclafani R.A. Cell cycle regulation of induced mutagenesis in yeast // Mutation Res. 1995. V. 329. P. 143–152.
10. Lorincz A.T., Reed S.I. Sequence analysis of temperature-sensitive mutations in the *Saccharomyces cerevisiae* gene *CDC28* // Mol. Cell. Biol. 1986. V. 6. P. 4099–4103.
11. Холмуродов Х.Т., Кретов Д.А., Герасимова А.С., Колтовая Н.А. Молекулярно динамическое моделирование замены консервативного глицина на серин в G-петле у мутанта *cdc28-srm* дрожжей с использованием кристаллической решетки киназы CDK2 человека // Биофизика. 2006. Т. 51. С. 679–691.
12. Колтовая Н.А., Девин А.Б. Мутации *srm* и γ -чувствительность дрожжей сахаромицетов // Труды рабочего совещания по генетическому действию корпускулярных излучений. Дубна, 1989. С. 145–149.
13. Колтовая Н.А., Девин А.Б. Координация митотической стабильности генетических структур и радиочувствительность дрожжей сахаромицетов // Докл. АН СССР. 1990. Т. 315. С. 986–990.
14. Koltovaya N.A., Arman I.P., Devin A.B. Mutation of the *CDC28* gene and the radiation sensitivity of *Saccharomyces cerevisiae* // Yeast. 1998. V. 14. P. 133–146.
15. Meyn M.A., Holloway S.L. S-phase cyclins are required for a stable arrest at metaphase // Curr. Biol. 2000. V. 10. P. 1599–1602.
16. Cuperus G., Shafaatian R., Shore D. Locus specificity determinants in the multifunctional yeast silencing protein Sir2 // EMBO J. 2000. V. 19. P. 2641–2651.
17. Traverso E.E., Baskerville C., Liu Y., Shou W., James P., Deshaies R.J., Charbonneau H. Characterization of the Net1 cell cycle-dependent regulator of the Cdc14 phosphatase from budding yeast // J. Biol. Chem. 2001. V. 276. P. 21924–21931.
18. Koltovaya N.A., Devin A.B. New nuclear gene mutations that cause coordinate changes in mitotic stability of various genetic structures in *Saccharomyces cerevisiae* // Yeast. 1995. V. 11. P. S72.
19. Horiuchi J., Silverman N., Pina B., Marcus G.A., Guarente L. *ADA1*, a novel component of the ADA/GCN5 complex, has broader effects than *GCN5*, *ADA2*, or *ADA3* // Mol. Cell. Biol. 1997. V. 17. P. 3220–3228.
20. Sherman F., Fink G.R., Hicks J.B. Laboratory course manual for methods in yeast genetics // Cold Spring Harbor Laboratory. 1986. NY.

21. Колтовая Н. А., Кадышевская Е. Ю. Ген *CDC28* и контроль клеточного цикла у дрожжей-сахаромицетов // Докл. РАН. 1997. Т. 357. С. 710–712.
22. McKee R. H., Lawrence C. W. Genetic analysis of γ -ray mutagenesis in yeast. III. Double-mutant strains // Mutation Res. 1980. V. 70. P. 37–48.
23. Kadyk L. C., Hartwell L. H. Sister chromatids are preferred over homologs as substrates for recombinational repair in *Saccharomyces cerevisiae* // Genetics. 1992. V. 132. P. 387–402.
24. Elledge S. J. Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis // Science. 1996. V. 274. P. 1664–1672.
25. Колтовая Н. А., Никулушкина Ю. В., Рощина М. П., Девин А. Б. Взаимодействие чекпойнт-генов *RAD9*, *RAD17*, *RAD24* и *RAD53* в определении чувствительности дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* к действию ионизирующей радиации // Генетика. 2007. В печ.
26. Game J. C., Birrell G. W., Brown J. A., Shibata T., Baccari C., et al. Use of a genome-wide approach to identify new genes that control resistance of *Saccharomyces cerevisiae* to ionizing radiation // Radiation Res. 2003. V. 160. P. 14–24.
27. Aboussekhra A., Chanet R., Zgaga Z., et al. *RADH*, a gene of *Saccharomyces cerevisiae* encoding a putative DNA helicase involved in DNA repair. Characteristics of radH mutants and sequence of the gene // Nucleic Acids Res. 1989. V. 17. P. 7211–7219.
28. Aboussekhra A., Chanet R., Adjiri A., Fabre F. Semidominant suppressors of Srs2 helicase mutations of *Saccharomyces cerevisiae* map in the *RAD51* gene, whose sequence predicts a protein with similarities to procaryotic RecA proteins // Mol. Cell. Biol. 1992. V. 12. P. 3224–3234.
29. Ubersax J. A., Woodbury E. L., Quang P. N., Paraz M., Blethrow J. D., Shah K., Shokat K. M., Morgan D. O. Targets of the cyclin-dependent kinase Cdk1 // Nature. 2003. V. 425. P. 859–864.
30. Boulton S. J., Jackson S. P. *Saccharomyces cerevisiae* Ku70 potentiates illegitimate DNA double-strand break repair and serves as a barrier to error-prone DNA repair pathways // EMBO J. 1996. V. 15. P. 5093–5103.
31. Boulton S. J., Jackson S. P. Identification of a *Saccharomyces cerevisiae* Ku80 homologue: roles in DNA double-strand break rejoining and in telomeric maintenance // Nucleic Acids Res. 1996. V. 24. P. 4639–4648.
32. Tsukamoto Y., Kato J.-I., Ikeda H. Silencing factors participate in DNA repair and recombination in *Saccharomyces cerevisiae* // Nature. 1997. V. 388. P. 900–903.
33. Koltovaya N. A., Devin A. B. Yeast genes involved in both cell cycle regulation at checkpoints and maintenance of various genetic structures // Biochem. Soc. Transactions. 1996. V. 24. P. 516.

34. *de la Torre-Ruiz M.A., Lowndes N.F. DUN1 defines one branch downstream of RAD53 for transcription and DNA damage repair in Saccharomyces cerevisiae // FEBS Lett. 2000. V. 485. P. 205–206.*
35. *Glaser V.M., Glasunov A.V., Tevzadze G.G., et al. Genetic control of plasmid DNA double-strand gap repair in yeast Saccharomyces cerevisiae // Current Genet. 1990. V. 18. P. 1–5.*
36. *Ira G., Pelliccioli A., Balijja A., Wang X., Fiorani S., Carotenuto W., Liberi G., Bressan D., Wan L., Hollingsworth N.M., Haber J.E., Foiani M. DNA end resection, homologous recombination and DNA damage checkpoint activation require CDK1 // Nature. 2004. V. 431. P. 1011–1017.*
37. *Grandin N., Charbonneau M. Mitotic cyclins regulate telomeric recombination in telomerase-deficient yeast cells // Mol. Cell. Biol. 2003. V. 23. P. 9162–9177.*
38. *Aylon Y., Kupiec M. Cell cycle-dependent regulation of double-strand break repair // Cell Cycle 2005. V. 4. P. e61–e63.*
39. *Liberi G., Chiolo I., Pelliccioli A., Lopes M., Plevani P., Muzi-Falconi M., Foiani M. Srs2 DNA helicase is involved in checkpoint response and its regulation requires a functional Mec1-dependent pathway and Cdk1 activity // EMBO J. 2000. V. 19. P. 5027–5038.*
40. *Chiolo I., Carotenuto W., Maffioletti G., Petrini J.H.J., Foiani M., Liberi G. Srs2 and Sgs1 DNA helicases associate with Mre11 in different subcomplexes following checkpoint activation and CDK1-mediated Srs2 phosphorylation // Mol. Cell. Biol. 2005. V. 25. P. 5738–5751.*
41. *Uetz P., Giot L., Cagney G., Mansfield T.A., et al. A comprehensive analysis of protein-protein interactions in Saccharomyces cerevisiae // Nature. 2000. V. 403. P. 623–627.*
42. *Clerici M., Baldo V., Mantiero D., Lottersberger F., Lucchini G., Longhese M.P. A Tel1/MRX-dependent checkpoint inhibits the metaphase-to-anaphase transition after UV irradiation in the absence of Mec1 // Mol. Cell. Biol. 2004. V. 24. P. 10126–10144.*
43. *Tamburini B.A., Tyler J.K. Localized histone acetylation and deacetylation triggered by the homologous recombination pathway of double-strand DNA repair // Mol. Cell. Biol. 2005. V. 25. P. 4903–4913.*
44. *Astrom S.U., Okamura S.M., Rine J. Yeast cell-type regulation of DNA repair // Nature. 1999. V. 397(6717). P. 310.*
45. *Lee S.E., Paques F., Sylvan J., Haber J.E. Role of yeast SIR genes and mating type in channeling double-strand breaks to homologous and nonhomologous recombination pathways // Curr. Biol. 1999. V. 9. P. 767–770.*

46. *Clikeman J., Khalsa G., Barton S., Nickoloff J.* Homologous recombinational repair of double-strand breaks in yeast is enhanced by *MAT* heterozygosity through yKU-dependent and -independent mechanisms // *Genetics*. 2001. V. 157. P. 579–589.
47. *Bird A. W., Yu D. Y., Pray-Grant M. G., Qlu Q., Harmon K. E., Megee P. C., Grant P. A., Smith M. M., Christman M. F.* Acetylation of histone H4 by Esa1 is required for DNA double-strand break repair // *Nature*. 2002. V. 419. P. 411–415.
48. *Qin S., Parthun M. R.* Histone H3 and the histone acetyltransferase Hat1p contribute to DNA double-strand break repair // *Mol. Cell. Biol.* 2002. V. 22. P. 8353–8365.
49. *Choy J.S., Kron S. J.* NuA4 subunit Yng2 function in intra-S-phase DNA damage response // *Mol. Cell. Biol.* 2002. V. 22. P. 8215–8225.
50. *Barlev N.A., Poltoratsky V., Owen-Hughes T., Ying C., Liu L., Carter T., Workman J.L., Berger S.L.* Repression of GCN5 histone acetyltransferase activity via bromodomain-mediated binding and phosphorylation by the Ku/DNA-PKcs complex // *Mol. Cell. Biol.* 1998. V. 18. P. 1349–1358.
51. *Gu W., Roeder R.* Activation of p53 sequence-specific DNA binding by acetylation of the p53 C-terminal domain // *Cell*. 1997. V. 90. P. 595–606.
52. *Liu D., Ishima R., Tong K.I., Bagby S., Kokubo T., Muhandiram D.R., Kay L.E., Nakataki Y., Ikira M.* Solution of a TBP-TAF_{II}230 complex: protein mimicry of the minor groove surface of the TATA box unwound by TBP // *Cell*. 1998. V. 94. P. 573–583.
53. *Liu L., Scolnick D.M., Trievel R. C., Zhang H. B., Marmorstein R., Halazonetis T. D., Berger S. L.* p53 sites acetylated in vitro by PCAF and p300 are acetylated in vivo in response to DNA damage // *Mol. Cell. Biol.* 1999. V. 19. P. 1202–1209.
54. *Sakaguchi K., Herrera J.E., Saito S., Miki T., Bustin M., Vassilev A., Anderson C. W., Appella E.* DNA damage activates p53 through a phosphorylation-acetylation cascade // *Genes. Dev.* 1998. V. 12. P. 2831–2841.
55. *Barlev N.A., Liu L., Chehab N.H., Mansfield K., Harris K. G., Halazonetis T. D., Berger S. L.* Acetylation of p53 activates transcription through recruitment of coactivators/histone acetyltransferases // *Mol. Cell*. 2001. V. 8. P. 1243–1254.
56. *Luo J., Nikolaev A.Y., Imai S., Chen D., Su F., Shiloh A., Guarente L., Gu W.* Negative control of p53 by Sir2 α promotes cell survival under stress // *Cell*. 2001. V. 107. P. 137–148.
57. *Vaziri H., Dessain S. K., Ng Eaton E., Imai S. I., Frye R. A., Pandita T. K., Guarente L., Weinberg R. A.* hSIR2 (SIRT1) functions as an NAD-dependent p53 deacetylase // *Cell*. 2001. V. 107. P. 149–159.
58. *Kondo T., Matsumoto K., Sugimoto K.* Role of a complex containing Rad17, Mec3, and Ddc1 in the yeast DNA damage checkpoint pathway // *Mol. Cell. Biol.* 1999. V. 19. P. 1136–1143.

59. Naiki T., Kondo T., Nakada D., Matsumoto K., Sugimoto K. Chl12 (Ctf18) forms a novel replication factor C-related complex and functions redundantly with Rad24 in the DNA replication checkpoint pathway // *Mol. Cell. Biol.* 2001. V. 21. P. 5838–5845.
60. Колтовая Н.А., Кадышевская Е.Ю. Checkpoint-контроль у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* // Тезисы докладов на Международной конференции "Проблемы радиационной генетики на рубеже веков". М., 2000. С. 130–131.

Получено 24 августа 2007 г.

Редактор *М. И. Зарубина*

Подписано в печать 16.11.2007.

Формат 60 × 90/16. Бумага офсетная. Печать офсетная.

Усл. печ. л. 1,68. Уч.-изд. л. 2,08. Тираж 220 экз. Заказ № 55960.

Издательский отдел Объединенного института ядерных исследований
141980, г. Дубна, Московская обл., ул. Жолио-Кюри, 6.

E-mail: publish@jinr.ru

www.jinr.ru/publish/