

P19-2007-132

Н. А. Колтовая*

**АКТИВАЦИЯ РЕПАРАЦИИ И ЧЕКПОЙНТ-КОНТРОЛЯ
ДВУНИТЕВЫМИ РАЗРЫВАМИ ДНК.
КАСКАД АКТИВАЦИОННОГО
ФОСФОРИЛИРОВАНИЯ БЕЛКОВ**

Направлено в журнал «Генетика»

*E-mail: koltovaya@jinr.ru

Колтовая Н. А.

P19-2007-132

Активация репарации и чекпойнт-контроля двунитевыми разрывами ДНК. Каскад активационного фосфорилирования белков

Рассматриваются молекулярные механизмы активации двунитевыми разрывами ДНК репарации повреждений и чекпойнт-контроля, в том числе фосфорилирование протеинкиназами репарационных и чекпойнтных белков, последствием которого является их активация, изменение сродства к белкам и локализации.

Работа выполнена в Лаборатории радиационной биологии ОИЯИ.

Препринт Объединенного института ядерных исследований. Дубна, 2007

Koltovaya N. A.

P19-2007-132

Activation of Repair and Checkpoints by Double-Strand Breaks of DNA. Activational Cascade of Protein Phosphorylation

Molecular mechanisms of double-strand breaks repair and checkpoints include phosphorylations of repair and checkpoint-proteins by protein kinases. Chemical modification of proteins has different consequences including activation, changing of affinity to proteins and localization.

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

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

*Памяти моего учителя и ментора
Александра Борисовича Девина посвящается*

Ионизирующая радиация индуцирует широкий спектр повреждений ДНК, в том числе двунитевые разрывы (ДНР) ДНК, играющие важную роль в гибели клеток и перестройках генома [1]. Ответу клетки на повреждения ДНК, в частности остановке клеточного цикла и репарации ДНР ДНК, посвящены многочисленные обзоры, рассматривающие генетику и механизмы различных путей репарации ДНР [см. обзоры 2–4]. На современном этапе исследований приобретают все большую актуальность вопросы доменной структуры белков, физического взаимодействия между репарационными и чекпойнтными белками, их структурных изменений и активации в процессе репарации и чекпойнт-ответа. Эффективным и широко распространенным способом регуляции активности многих ферментов и белков является химическая модификация молекулы белка, происходящая под действием протеинкиназ [5, 6]. Протеинкиназы — многочисленное семейство ферментов, катализирующих перенос концевой остатка фосфата с АТФ на различные группы в структуре белка. Перенос отрицательно заряженной группы сопровождается крупными структурными перестройками в молекуле белка-мишени [7]. Фосфорилирование мишенного белка может вызывать различные последствия, например, может активировать фермент, повышать сродство к другим белкам или менять локализацию белка. Основные механизмы молекулярных процессов репарации и чекпойнт-контроля в клетке схожи для высших и низших эукариот, найдены ортологичные белки (см. таблицу). В настоящем обзоре подробно рассматриваются ранние этапы активации репарации и чекпойнт-контроля на примере дрожжей-сахаромицетов, как наиболее изученном объекте. Особое внимание уделено активации протеинкиназами белков репарации и чекпойнта.

ВЫБОР ПУТИ РЕПАРАЦИИ ДНР ДНК

С концами ДНР связываются белковые комплексы MRX (*MRE11/RAD50/XRS2*) и Ku, удерживающие и процессирующие концы ДНР (рис. 1). Комплекс MRX участвует в инициации двух ветвей репарации гомологичной (HR — *homolog recombination*) и негомологичной (NHEJ — *nonhomologous*

Ортологические группы белков

Yeast (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	Human
MRX (Mre11-Rad50-Xrs2)	MRN (Mre11-Rad50-Nbs1)
Ku (Yku70/Hdf1-Yku80/Hdf2)	Ku (Ku70-Ku80)
RPA (Rpa1-Rpa2-Rpa3)	RPA
	DNA-ПК
Dnl4 /Lif1	ДНК-лигаза 4/Xrcc4
Pol4 (ДНК-полимераза 4)	(pol μ , pol λ)
Fen1	Artemis
Sae2	
Pso2	
Rad51	Rad51
Rad52	Rad52
Exo1	
Rad27	
Srs2	
CDC28	CDK1
Mec3/Rad17/Ddc1	Rad9/Hus1-Rad1 (9-1-1)
Rad24/Rfc2-5	Rad17/RFC
Mec1, Tel1	ATR, ATM
Chk1	Chk1
Rad53	Chk2
Rad9	Claspin
Mrc1	Brcal
Dun1	Cds1

end joining). Комплекс белков Ku обеспечивает инициацию незаконной рекомбинации (NHEJ).

Репарация ДНР по механизму HR может происходить в гаплоидных и в диплоидных клетках при наличии в клетке гомологичных хромосом или хроматид. В поздней S-фазе и в фазе G2 гаплоидной клетки преимущественной является HR между сестринскими хроматидами [8]. Способность к репарации путем HR определяется не только наличием гомолога, но и активностью киназы CDC28 [9, 10].

Протеинкиназа CDC28/CDK1 является центральной киназой, регулирующей прохождение клеточного цикла, и относится к семейству циклин-зависимых серин/треониновых киназ CDK (*cyclin dependent kinase*) [11]. Для активации каталитической субъединицы CDK требуется связывание с регуляторной субъединицей — циклином. У дрожжей киназа CDC28 активируется девятью циклинами: три G1-циклина (Cln1, Cln2 и Cln3) участвуют в регуляции активации деления клетки (так называемый СТАРТ) и шесть циклинов

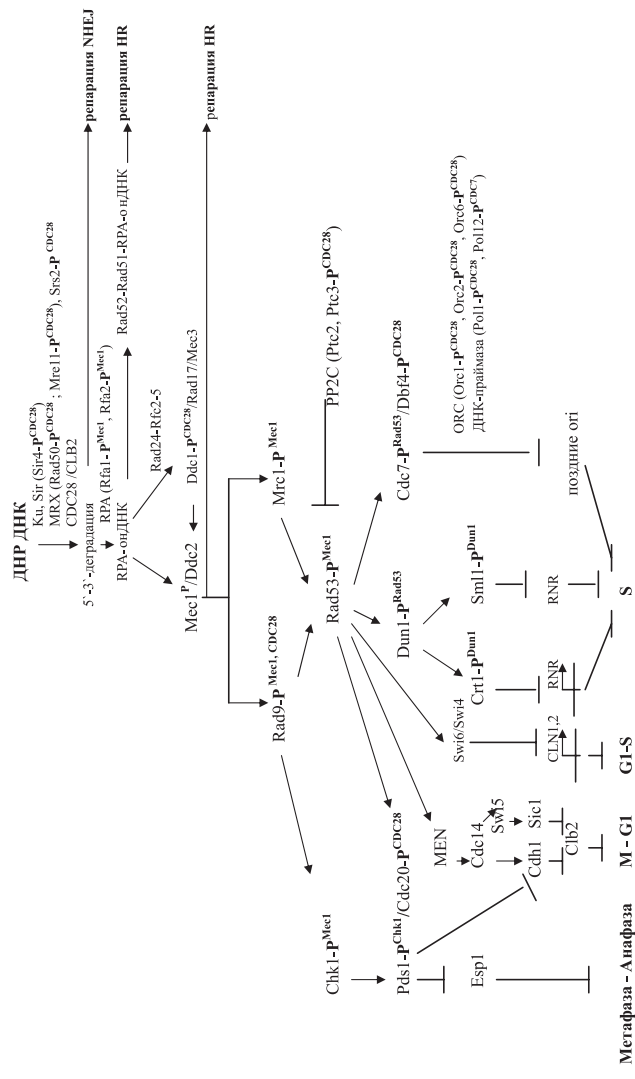


Рис. 1. Схема активации репарации и чекпойнт-контроля у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Для активации чекпойнта необходимы деградации концов ДНР ДНК комплексом MRX и последующая загрузка RPA на онДНК. Связывание чекпойнт-комплекса Mec1p/Ddc2p с RPA приводит к активации Mec1. Взаимодействие комплекса Mec3p/Rad17p/Ddc1p с киназой Mec1 приводит к дальнейшему фосфорилированию киназы Mec1 и увеличению ее активности. Передача сигнала осуществляется в результате фосфорилирования киназой Mec1 эффекторов киназ Chk1 и Rad53-Rad9p и Mtc1p. Далее активные киназы Chk1 и Rad53 передают сигнал многочисленным мишенным белкам (см. текст). В случае фосфорилированных форм белков указаны киназы, осуществляющие фосфорилирование, например, P^{CDc28} , P^{Mec1} и т.д.

В-типа (Clb1-Clb6) участвуют в регуляции S-фазы и митоза [12, 13]. Митотические циклины функционируют попарно, т.е. Clb1-Clb2, Clb3-Clb4 и Clb5-Clb6. Гены *CLB* имеют специфические, но часто перекрывающиеся, а иногда излишние функции. Пары циклинов Clb5-Clb6 и Cln1-Cln2 участвуют в инициации репликации ДНК. Пик синтеза этих пар наблюдается на границе фаз G1 и S. Циклины Clb3-Clb4 участвуют в запуске, а Clb1-Clb2 в контроле митоза и, соответственно, пики синтеза для них наблюдаются в G2 и M. Активность киназы CDC28 на протяжении клеточного цикла меняется: она высока в фазах G2 и M, низка, но детектируема в фазе G1. Таким образом, максимум достигается при прохождении G2/M, т.е. соответствует митотическим формам. Анализ последствий разрушения разных генов *CLB* показал, что из четырех митотических циклинов наибольшее значение имеет Clb2p. Циклин Clb2 составляет 40% от количества всех митотических циклинов [14]. Киназная активность, ассоциированная только с одним комплексом CDC28/CLB2, выше, чем с тремя остальными [15]. Для активной формы киназы CDC28/CLB2 систематический анализ выявил 360 субстратов [16]. Субстраты киназы CDK, как правило, имеют множественные сайты фосфорилирования (S/T-P-x-K/R).

Киназа CDC28 обеспечивает выбор пути репарации (HR или NHEJ) в фазах G1 и G2, поскольку ее активность необходима для протяженной деградации концов ДНР комплексом MRX [9]. Деградация ДНР ДНК почти полностью зависит от комплекса MRX в фазе G2 и лишь частично — в фазе G1 [17]. В фазе G2 на фоне высокой активности киназы CDC28 и эффективной деградации концов ДНР ДНК могут репарироваться HR-путем. В фазе G1 отсутствует гомологичная матрица, и на фоне низкой активности киназы CDC28 комплекс MRX хотя и связывается с ДНР ДНК, но высокая стабильность концов ДНР ДНК стимулирует NHEJ. В процессе NHEJ деградация ДНР ДНК осуществляется нуклеазами Mre11 и Exo1. Для деградации ДНР нуклеаза Mre11 нуждается в 3'-5'-ДНК-геликазе [18].

Предполагается, что киназа CDC28 в фазе G2 регулирует статус фосфорилирования комплекса MRX и других факторов, участвующих в процессировании ДНР ДНК. Действительно, некоторые белки, участвующие в рекомбинации ДНК, являются субстратами CDK, включая геликазу Srs2 и субъединицы комплекса MRX — Mre11p и Rad50p [19, 16]. Показано функциональное взаимодействие между киназой CDC28/CLB2 и комплексом MRX в процессе митотического цикла, рекомбинации и репарации [20, 10]. У белка Mre11p обнаружено несколько cdk-консенсусных сайтов, которые потенциально могут быть фосфорилированы киназой CDC28. Однако мутации в этих сайтах не влияют на активацию чекпойнт-контроля и, по-видимому, на деградацию концов разрыва [9].

В необлученных клетках эндонуклеаза Mre11 вместе с геликазами Srs2 и Sgs1 входит в состав большого комплекса. При облучении происходит

индуцибельное фосфорилирование геликазы Srs2 киназой CDC28 и зависимое от киназы Mec1 образование отдельных комплексов Sgs1p/Mre11p и Srs2p/Mre11p [21]. Фосфорилирование обоих белков Srs2 и Mre11 необходимо для образования субкомплексов. Нарушение у геликазы Srs2 сайтов фосфорилирования киназой CDC28 блокирует их образование. Возможно, более крупный комплекс используется в качестве центра хранения ферментов до момента их востребования.

Белок Xrs2 (рис. 2), входящий в состав комплекса MRX, в С-концевом участке содержит сайт связывания Mre11p MBX (*Mre11-binding domain of Xrs2*), по обе стороны от которого располагаются сигнальные последовательности ядерной локализации NLS (*nuclear localization signal*) в позициях 320–629 и 766–854 [22]. Xrs2p обеспечивает доставку белка Mre11 из цитоплазмы в ядро, где он связывается с белком Rad50. В результате образуется комплекс MRX, состоящий из белков Mre11, Rad50 и Xrs2 в отношении 2:2:1. Rad50p осуществляет АТФ-зависимое связывание комплекса с ДНР ДНК [23]. Связывание комплекса с АТФ вызывает конформационные изменения белка Rad50, что, в свою очередь, стимулирует нуклеазную активность Mre11p. Роль фосфорилирования Mre11p и Rad50p киназой CDC28 пока не известна.

В случае диплоидной клетки в любой стадии цикла существует два набора хромосом и, следовательно, возможность HR для репарации ДНР ДНК. В диплоидных клетках на протяжении всего клеточного цикла и в гаплоидных клетках в фазе G2 предпочтительное прохождение HR и подавление NHEJ осуществляет специализированная система регуляции. Уровень NHEJ определяется статусом локуса типа спаривания *MAT*, регулирующим транскрипцию: в частности, у гетерозигот по типу спаривания репрессирован ген *NEJ1*. Репрессия гена *NEJ1*, участвующего в NHEJ, направляет репарацию по пути HR, а не NHEJ [24, 25]. Диплоидные клетки, у которых происходит экспрессия α и β , имеют более низкий уровень NHEJ, чем гаплоидные клетки, экспрессирующие α или β [26–28]. Разрушение генов *SIR2*, *SIR3* и *SIR4*, участвующих в транскрипционном сайленсинге, снижает эффективность NHEJ [29]. Этот эффект обусловлен в основном дерепрессией сайленсинга локусов *HML α* и *HML β* , приводящей к соэкспрессии α - и β -информации в гаплоидных клетках [26, 27].

В стационарных диплоидных клетках HR протекает по пути межхромосомной рекомбинации. Известно, что для межхромосомной рекомбинации необходима геликаза Srs2, активация которой осуществляется CDC28-зависимым способом. Гаплоидные мутанты *srs2* проявляют слабую чувствительность к повреждениям ДНК, в то время как диплоидные клетки высокочувствительны к γ -излучению [30, 31]. Аналогичная картина наблюдается и для мутанта *cdc28-srm* [32].

Киназа CDK представляет собой белковую молекулу, состоящую из двух глобул, в щели между которыми располагается молекула АТФ [33]. В фор-

мировании щели принимают участие Т- и G-петли, локализованные в разных глобулах. Полная активация киназы осуществляется в результате присоединения циклина, фосфорилирования остатка T169 в Т-петле и дефосфорилирования остатков Y19 и T18 в G-богатой петле. В результате структура киназы меняется, щель расширяется и фосфатная группа АТФ становится доступной субстрату. Мутация *cdc28-srm* представляет собой замену консервативного глицина на серин G20S в G-петле [34]. Компьютерное молекулярно-динамическое моделирование показало, что замена одного аминокислотного остатка вызывает заметные изменения структуры киназы, что влечет за собой, по-видимому, изменения взаимодействия киназы с циклинами, субстратами и молекулой АТФ [34].

Гаплоидные мутанты *cdc28-srm* проявляют слабую чувствительность к повреждениям ДНК, в то время как диплоидные клетки высоко-чувствительны к γ -излучению [32]. Мутация *cdc28-srm* повышает радиочувствительность клеток, увеличивает спонтанный и снижает индуцированный γ -облучением уровень генной конверсии [32]. Полученные данные позволяют предположить, что киназа CDC28 принимает участие в межхромосомной рекомбинации. Анализ радиочувствительности диплоидных клеток в стационарной фазе роста показал, что мутация *cdc28-srm* увеличивает радиочувствительность мутанта *rad52* с заблокированной HR [32]. По-видимому, это связано с нарушением минорного пути репарации NHEJ или чекпойнт-контроля. Введение дополнительной чекпойнт-мутации *rad53* в генотип двойного мутанта *cdc28-srm rad52* не приводит к дополнительному увеличению чувствительности к γ -облучению. Известно, что мутация *rad53* снижает эффективность как HR [35], так и NHEJ [36], но не известно, связано ли это с торможением клеточного деления, индукцией репарационных генов или регуляцией уровня гистонов. Показано, что повышение чувствительности к повреждениям ДНК и снижение стабильности хромосом у мутанта *rad53* частично обусловлено нарушением регуляции уровня гистонов [37]. Двойной мутант *cdc28-srm rad53* более радиочувствителен, чем одиночный мутант *rad53*, по-видимому, за счет дополнительной репарационной функции CDC28 [38].

Важность киназы CDK1/CDC28 в отклике на повреждения ДНК продемонстрирована во многих работах [39–42, 9, 19, 20]. Выявлено участие циклинов в отклике на повреждения ДНК: так, потеря S-циклинов Clb5 и Clb6 вызывает повышение чувствительности клеток к действию ММС, УФ-света и ионизирующей радиации [41]. Как показал анализ рекомбинационного восстановления клеток с нарушенной теломеразой, киназа CDC28/CLB2 контролирует два пути гомологичной рекомбинации: Rad50p/Rad59p (Rad52p, Rad50p, Mre11p, Xrs2p, Rad59p, Sgs1p) и Rad52p-зависимый Rad50p-, Rad51p-независимый [20]. Для дрожжей *S. pombe* показано участие киназы Cdc2/циклин В в регуляции рекомбинационной репарации индуцированных радиацией ДНР ДНК в фазе G2 [39]. При этом дефект киназной активно-

сти CDK1 влияет на образование центров Rhp51p (ортолог Rad51p) в ответ на действие ионизирующей радиации. Кроме того, активность циклин-зависимой киназы CDK1-циклин В совместно с чекпойнт-белком Ctb2 необходима для поддержания функциональной активности топоизомеразы III.

На начальных этапах репарации ДНР ДНК активность комплекса MRX мала. Деграция ДНР ДНК комплексом MRX приводит к образованию коротких участков одонитевой ДНК (онДНК), с которыми связывается белок RPA, являющийся аналогом бактериального белка *ssb* (*single strand binding protein*). RPA предотвращает формирование вторичной структуры концами онДНК. Образование нуклеопротеиновых филаментов онДНК-RPA позволяет привлечь к повреждению ДНК комплекс Mec3p/Rad17p/Ddc1p. Этот комплекс играет важную роль в инициации HR [43]. Структура комплекса Mec3p/Rad17p/Ddc1p схожа со структурой гомотримера PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*), удерживающего ДНК-полимеразу на ДНК и увеличивающего ее процессивность [44]. PCNA загружается на ДНК в процессе репликации с помощью комплекса RFC (*replication factor C*). PCNA-подобный комплекс Mec3p/Rad17p/Ddc1p загружается на конец ДНР с помощью RFC-подобного комплекса Rad24p/Rfc2-5, содержащего белок Rad24 вместо субъединицы Rfc1 [45–47]. Комплекс Rad24p/RFC узнает структуры ДНР ДНК с участками онДНК [48] и связывается с RPA, покрывающим район онДНК [49]. После гидролиза АТФ комплекс Mec3p/Rad17p/Ddc1p освобождается от комплекса Rad24p/RFC [50].

Инактивация любого белка в составе комплексов Mec3p/Rad17p/Ddc1p и Rad24p/RFC приводит к резкому замедлению процессинга концов ДНР [51]. Можно предположить, что комплекс Mec3p/Rad17p/Ddc1p служит в качестве «скрепки» для комплекса MRX и повышает процессивность MRX при образовании хвостов онДНК. В клетках с нормально функционирующим комплексом Mec3p/Rad17p/Ddc1p образуются длинные хвосты онДНК, которые могут достигать 10 тпн и более [52] и являются необходимым условием запуска HR. Для комплекса Rad24p/RFC показано участие в выборе партнера для рекомбинации [51]. Формирование длинного конца онДНК-RPA стимулирует образование нуклеопротеинового филамента Rad51-Rad52-онДНК [4], причем Rad52p и комплекс Rad55p-Rad57p служат кофакторами процесса HR (рис. 1).

Для NHEJ требуется три взаимодействующих друг с другом комплекса — Ku (Yku70p/Yku80p), MRX (Mre11p/Rad50p/Xrs2p) и ДНК-лигаза IV (Dnl4p/Nej1p). Гетеродимер Ku связывает концы разрыва. Затем с этим комплексом связываются другие комплексы. Субъединица Yku80p может связываться с Mre11p, Xrs2p и Dnl4p [53]. Например, С-концевой домен белка Yku80p связывается с FHA-доменом белка Xrs2 (рис. 2). Во многих механизмах клеточного контроля FHA-домен (*forkhead-associated domain*) служит модулем белок-белкового взаимодействия, облегчает узнавание и связывание с

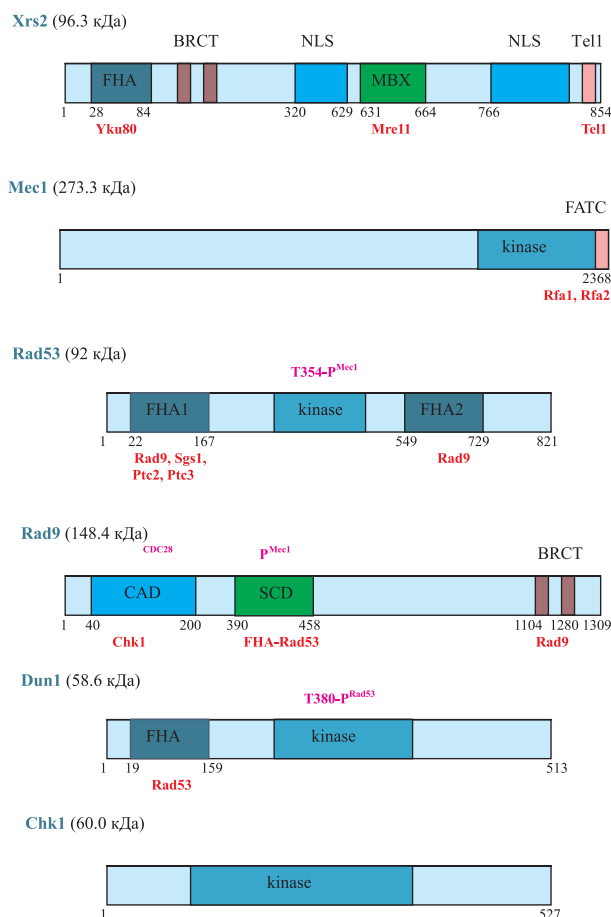


Рис. 2. Схема белков Xrs2, Mec1, Rad53, Rad9, Dun1 и Chk1. Указано положение структурных элементов, определяющих: сайт связывания Xrs2p с Tel1p — Tel1, Xrs2p-Mre11p — MBX (*Mre11-binding domain*), сигнал ядерной локализации — NLS (*nuclear localization signal*); киназную активность Rad53 — kinase и взаимодействия Rad53p-Rad9p — FHA (*forkhead-associated domain*); взаимодействия Rad9p с Chk1p — CAD (*Chk1 activation domain*); взаимодействия Rad9p с Rad53p — SCD (*[S/T]Q cluster domain*); взаимодействия Rad9p с Rad9p — BRCT (*BRCA1 C-terminus*); киназный и FHA-домен киназы Dun1. Под боксами указаны белки, связывающиеся с этими доменами. Для белков Rad53, Rad9, Dun1 указаны сайты фосфорилирования

фосфорилированными белками [54]. Размер FHA-домена составляет порядка 140 аминокислотных остатков. FHA-домен образует компактную глобулярную структуру. Анализ структуры домена FHA1-Rad53 показал, что аминокис-

слотные остатки упакованы в два антипараллельных β -листа с короткой α -спиралью на С-конце [55]. N-конец белка Xrs2 отвечает за участие в NHEJ, участия N-конца в функционировании MRX не обнаружено [56]. Также Xrs2p взаимодействует физически с Nej1p [53], и это взаимодействие облегчает ассоциацию MRX с ДНК-лигазой 4 [57].

У дрожжей ДНР ДНК индуцирует перемещение Yku70p, Yku80p, Sir3p и Sir4p с теломерных участков депонирования к месту повреждения, этот процесс является Rad9p-зависимым [58]. Используя дигибридную систему, Tsukamoto с соавторами обнаружили взаимодействие белков Yku70 и Sir4 [29]. По-видимому, с концами ДНР ДНК связывается Yku70p, привлекающий к ДНР Sir4p, который в свою очередь взаимодействует с Sir2p и Sir3p. Белок Sir4 является субстратом киназы CDC28, но функциональная роль фосфорилирования Sir4p не известна. Белки сайленсинга Sir модифицируют структуру хроматина, взаимодействуя с аминоконцами гистонов H3 и H4 [59], принимают участие в создании неактивной хроматиновой структуры, предотвращая деградацию концов онДНК. Белки Sir2, Sir3, Sir4 вместе с Yku70p фиксируют и модифицируют концы разорванной ДНК. Анализ эффективности NHEJ показал участие генов *SIR2*, *SIR3* и *SIR4* в воссоединении концов разрыва [29, 60]. Причем белки Yku70, Yku80 и гены *SIR2*, *SIR3*, *SIR4*, *SRS2* необходимы для эффективного и безошибочного соединения липких концов разрыва ДНК [61]. Для репарации тупых концов ДНК необходимы гены *RAD50*, *RAD52*, *SRS2*, а процесс воссоединения концов разрыва сопровождается делециями. Белки Yku70 и Yku80 принимают участие также в HR — внутриврохромосомной рекомбинации между повторами путем SSA [62].

В клетках млекопитающих роль комплекса MRX в объединении концов двунитевого разрыва выполняет каталитическая субъединица ДНК-зависимой протеинкиназы (ДНК-ПК) [54, 63]. При связывании с концами ДНР ДНК-ПК происходит автофосфорилирование по двум кластерам аминокислот и фосфорилирование обеих субъединиц комплекса Ku [64]. Эти события приводят к потере активности и распаду киназного комплекса. Модификация первого кластера ABCDE изменяет конформацию комплекса, критичную для процессинга концов ДНР ДНК, в результате чего блокируются как NHEJ, так и HR [65]. Блокирование фосфорилирования второго кластера приводит к повышению эффективности обоих путей репарации [66].

Как мы видим, к сайту повреждения ДНК доставляются многочисленные комплексы, некоторые из них играют роль в репарации ДНК и передаче сигнала остановки клеточного цикла. Поскольку потенциально могут реализоваться различные процессы, то должна существовать сложная система регуляции выбора реализуемого процесса. Согласно предложенной модели [67], повреждение ДНК вначале детектируется специфическими репарационными факторами, которые имеют высокую аффинность к специфич-

ческим типам первичных повреждений ДНК. В некоторых случаях повреждения могут относительно легко репарироваться и, таким образом, вскоре после обнаружения повреждения ДНК быстро восстанавливаются. В этом случае повреждение не активирует чекпойнт-ответ, поскольку сигнальная система Mec1p/Tel1p не успевает обнаружить повреждение. Если повреждение ДНК не восстанавливается быстро и сохраняется продолжительное время, то к месту повреждения доставляется комплекс Mec1p/Ddc2p, который модифицирует мишени вблизи повреждения, например репарационные ферменты и гистоны H2A. Если затем осуществляется полная репарация, то и на этот раз предотвращается глобальный ответ на повреждения ДНК. Однако если репарация ДНК все еще не может быть завершена, то привлекаются другие комплексы. Mec1p-зависимым способом активируются киназы Rad53 и Chk1 и запускается глобальный ответ на повреждения ДНК, включающий остановку клеточного цикла, дальнейшее изменение структуры хроматина и регуляцию репарационного потенциала клетки. Все эти реакции облегчают репарацию повреждений и предотвращают прохождение ключевых стадий клеточного цикла. Общая схема активации чекпойнт-остановки приведена на рис. 1. На протяжении клеточного цикла существует несколько точек проверки целостности генома — G1/S-чекпойнт, S-чекпойнт (блок репликации гидроксимочевинной), intra S-чекпойнт (замедление репликации), G2/M-чекпойнт и M/A-чекпойнт.

АКТИВАЦИЯ ЧЕКПОЙНТ-КОНТРОЛЯ

Сигналом для чекпойнта является онДНК [68]. Активация чекпойнта пропорциональна степени деградации ДНР и протяженности онДНК [69, 70]. Для активации чекпойнта необходимы деградация концов ДНР ДНК и последующая загрузка RPA на онДНК. Белки, принимающие участие в формировании онДНК на ранних стадиях репарации и взаимодействующие с онДНК, необходимы для активации чекпойнта. Нарушение комплекса MRX ведет к дефекту чекпойнта [71–75]. Mre11p ассоциирует с ДНР на ранних стадиях [76] и участвует в киназном каскаде передачи сигнала. Геликазы Srs2 и Sgs1 также участвуют в активации чекпойнта [77]. Показано участие MRX и геликазы Sgs1 в активации intra S-чекпойнта [78, 79]. Для чекпойнта необходимо фосфорилирование геликазы Srs2 киназой CDC28. У мутанта *srs2* не происходит активации киназы Rad53 сигнального чекпойнт-каскада, замедления репликации в ответ на intra S-повреждения ДНК [19] и инактивации чекпойнта в процессе адаптации и восстановления деления [52].

Использование мутации *cdc28-as1* [F88G] показало, что киназа CDC28 необходима для активации ДНР ДНК Mec1p-зависимой остановки клеточного цикла в фазе G2 [9]. К субстратам CDC28 помимо субъединиц комплекса

MRX относятся такие чекпойнт-белки, как Rad9, Drc1/Sld2, Ddc1, Dun1 и Ptc3 [16, 80, 81]. Мутация *cdc28-srm* снижает эффективность чекпойнт-зависимой остановки деления в фазе G2 у репликативных мутантов *cdc9-1* и *cdc6-1* в условиях рестриктивной температуры [82]. Мутация *cdc28-srm* [83] или ингибирование киназной активности CDC28 [19] не влияют на активацию S-чекпойнта в ответ на вызванный гидроксимочевинной (HU) арест в фазе S. Обработка HU приводит к истощению пула нуклеотидов и формированию в застрявших репликативных вилках протяженных участков онДНК на запаздывающей нити.

Киназа CDC28, по-видимому, влияет на активацию Mec1p-зависимой остановки только в случае, если повреждение представляет собой ДНР ДНК, нуждающийся в деградации для образования онДНК, и активность киназы CDC28 не нужна для активации чекпойнта предсуществующими интермедиатами онДНК в процессе эксцизионной репарации нуклеотидов (NER — *excision repair of nucleotide*) или HU-обработки. Иными словами, ингибирование киназной активности CDC28 нарушает активацию остановки, индуцированной ДНР ДНК, но оно не существенно для других типов повреждений, индуцирующих Mec1p-зависимую активацию чекпойнта. Например, в G1-клетках, обработанных УФ-миметиком 4NQO, наблюдается фосфорилирование киназы Rad53 [42]. В дальнейшем было показано, что при УФ-облучении в фазе G1 индуцированное фосфорилирование киназы Rad53 зависит от киназной активности CDC28/CLB2 [84]. У мутанта *cdc28-srm* наблюдается снижение задержки деления клеток при УФ-облучении культур, синхронизованных в фазах G0 или G1 [83]. Мутация *cdc28-5M*, представляющая собой множественные замены (L11H, L183S, S216C, E217K, N232D), нарушает остановку клеточного цикла, индуцированную УФ-повреждениями и нокодазолом, но не HU [85]. У мутанта *cdc28-5M* наблюдается снижение киназной активности, включая CLB2-, CLB5-, CLB6-, но не CLB3-ассоциированной CDK-активности. Слабое влияние на чекпойнт оказывают также мутации *cdc28-9* и *cdc28-13*. У мутантов *cdc28-4*, *-9*, *-13*, *-5M* снижена способность поддержания центромерной плазмиды [85], так же как и у мутанта *cdc28-srm* [86].

К месту разрыва доставляется киназа Mec1. Для связывания киназы Mec1 с ДНР ДНК необходим белок Ddc2. Загрузка киназного комплекса Mec1p-Ddc2p зависит от предварительного связывания ДНК с RPA [87, 27] и осуществляется через взаимодействие обоих белков с RPA [67, 70]. Показано физическое взаимодействие между Mec1p и субъединицами Rfa1p и Rfa3p [88]: в частности С-терминальный фрагмент Mec1p взаимодействует с Rfa1p и Rfa2p [89].

Киназа Mec1 относится к консервативному семейству так называемых фосфатидилинозитол-3-киназ [90], к которому принадлежат киназы Tel1 у дрожжей и ATM, ATR и ДНК-ПК у млекопитающих [91]. В С-концевой последовательности киназ Mec1 и Tel1 обнаруживается каталитический до-

мен PI-3-киназа, но несмотря на это киназы не фосфорилируют жиры. Вместо этого все вышеупомянутые киназы фосфорилируют белковые субстраты по консенсусным последовательностям SQ/TQ, которые часто образуют кластеры, называемые SCD (*SQ/TQ-rich cluster domains*). Киназа Mec1 отвечает на различные типы повреждений ДНК и играет центральную роль в активации чекпойнта — повреждениями ДНК и блоком репликации [45]. Хотя киназа Tel1 также участвует в репарации, рекомбинации и регуляции клеточного цикла [92, 93], но играет минорную роль в ответ на возникновение ДНР ДНК [94–96]. Предполагается, что Tel1p/MRX-зависимый путь активируется в присутствии ДНР, расщепление которых затруднено, а Mec1p/MRX-зависимый путь участвует в обнаружении разрывов, поддающихся процессингу. Повреждения ДНК вызывают Tel1p-зависимое фосфорилирование Mre11p и Xrs2p [71, 74]. Показано, что Tel1p-зависимое фосфорилирование Xrs2p необходимо для G1/S-чекпойнта [97], и Tel1p контролирует повреждения, возникающие в фазе S [95]. Анализ синхронизованных культур показал, что существует дополнительный MRX-независимый Tel1p-зависимый чекпойнт, активация которого происходит в поздней фазе S, в процессе репликации ДНК в присутствии ДНР [98]. Мутация *tel1* усиливает эффект мутации *mec1* в S-фазе. В фазе S Tel1p фосфорилирует Xrs2p [94, 96].

Чекпойнт-комплекс Mec1p/Ddc2p связывается с комплексом RPA через субъединицу Ddc2 [99], и это связывание приводит к его активации. При этом две субъединицы Mec1p фосфорилируют друг друга и комплекс разрушается, высвобождая активную форму киназы Mec1. Взаимодействие комплекса Mec3p/Rad17p/Ddc1p с киназой Mec1 приводит к дальнейшему фосфорилированию киназы Mec1 и увеличению ее активности. Активная киназа Mec1 осуществляет химическую модификацию RPA. Известно, что в невозмущенных клетках Rfa2p субъединица белка RPA фосфорилируется в S- и G2-фазах клеточного цикла [100]. В ответ на повреждение ДНК и при блокировании репликации с помощью HU происходит фосфорилирование двух субъединиц — Rfa1p и Rfa2p [100, 101]. Оба вида фосфорилирования RPA — во время прохождения клеточного цикла или в ответ на повреждение ДНК и блок репликации — контролируются у *S. cerevisiae* киназой Mec1 [100–102]. Индуцированное фосфорилирование зависит также от Rad53p. Фосфорилирование RPA необходимо для G1/S-, intra S- и G2/M-чекпойнтов и совместно с комплексом Rad24p/RFC, по-видимому, обеспечивает подачу сигнала [103, 104].

КИНАЗНЫЙ КАСКАД ПЕРЕДАЧИ СИГНАЛА

Передача сигнала от сенсоров к аппарату клеточного деления осуществляется в результате фосфорилирования киназой Mec1 адапторов (эффektorов)

киназ Chk1 и Rad53 [105–107]. Гиперфосфорилирование адапторного белка Rad9 специфически вызывается повреждениями ДНК, но не ингибированием репликации ДНК [108]. Rad9p необходим для передачи сигнала в фазах G1 и G2/M. В фазе S сигнал передает другой адаптор — ассоциированный с репликативной вилкой белок Mrc1 [109, 110].

В клетке гипофосфорилированный белок Rad9 обнаруживается в составе двух комплексов 850 и 560 кДа, содержащих шапероны Ssa1 и Ssa2, по-видимому, ремодулирующие его [111]. В комплексе меньшего размера обнаруживается также киназа Rad53. Белок Rad9 имеет в С-концевой последовательности два BRCT-домена (*BRCA1 C-terminus*) (рис. 2), облегчающие взаимодействие Rad9p-Rad9p при повреждении ДНК [112]. Этот мотив обнаружен у многих белков, участвующих в репарации, рекомбинации ДНК и чекпойнте.

Адапторный белок Rad9 имеет множественные сайты фосфорилирования киназой Mec1 [113–114]. При возникновении повреждения ДНК белок Rad9 связывается с повреждением, где происходит его полное фосфорилирование киназой Mec1 [113]. Гиперфосфорилированный белок Rad9p входит в состав комплекса уже меньшего размера. Гиперфосфорилирование Rad9p зависит от киназ Mec1 и Tel1, кроме этого в некоторых условиях необходимы также комплексы Mec3p/ Rad17p/Ddc1p и Rad24p/RFC [114, 115]. Гиперфосфорилирование белка Rad9 в асинхронных или быстро растущих культурах, в синхронизированных нокодазолом G2/M-клетках, при HU-индуцированной остановке клеточного цикла зависит от генов *MEC1* и *TEL1*. В синхронизированных α -фактором G1-клетках, помимо гена *MEC1*, гиперфосфорилирование Rad9p зависит от функционирования генов *RAD17*, *RAD24*, *MEC3* и *DDC1*, по-видимому, за счет увеличения процессивности комплекса MRX комплексом Mec3p/Rad17p/Ddc1p, для загрузки которого необходим комплекс Rad24p/RFC. Таким образом, наблюдается специфичность участия чекпойнт-генов в отклике на повреждения ДНК в зависимости от стадии клеточного цикла.

В УФ-облученных клетках фосфорилированный белок Rad9 взаимодействует с фосфорилированной киназой Rad53, являющейся ортологом киназы человека hChk2 [115]. Мутантный белок Rad9, утративший ключевые мишеные остатки фосфорилирования SQ и TQ, утрачивает способность связывать и активировать киназу Rad53 в ответ на воздействие MMC [116]. Взаимодействие между фосфорилированными формами белков Rad9 и Rad53 опосредовано FHA-доменами киназы Rad53 [108]. Киназа Rad53 имеет два FHA-домена, обозначенные как FHA1 (N-концевой) и FHA2 (С-концевой) (рис. 2). Оба FHA-домена киназы Rad53 связываются непосредственно с фосфорилированным белком Rad9 [108, 54]. Однако эти домены имеют разную специфичность связывания. FHA1 предпочтительно связывается с ST(P), а FHA2 связывается как с S(P)T, так и с ST(P).

Киназа Rad53 является непосредственной мишенью киназы Mec1. Для активации Rad53p требуется фосфорилирование множественных сайтов фосфорилирования киназой Mec1 [107]. Эффективное прямое фосфорилирование Rad53p киназой Mec1 наблюдается только в присутствии фосфорилированной формы Rad9p. Для стимулирующей активности Rad9p требуется фосфо- и FНА-зависимое взаимодействие с Rad53p, которое позволяет Rad53p быть узнаваемым в качестве субстрата киназой Mec1. В свою очередь, возобновление клеточного цикла происходит в результате инактивирования киназы Rad53. Фосфорилированные формы двух фосфатаз типа PP2C (*protein phosphatase type 2C*) — Ptc2p и Ptc3p — связываются с FНА1 доменом Rad53p и инактивируют Rad53p-зависимый путь в результате дефосфорилирования Rad53p [117]. Отметим, что фосфатаза Ptc3p также дефосфорилирует регуляторный остаток T169 киназы CDC28 [11] и, в свою очередь, является мишенью киназы CDC28 [16]. Можно предположить, что киназа CDC28 участвует не только в активации, но и в инактивации чекпойнта.

Киназа Mec1 играет двойную роль в активации киназы Rad53. После обнаружения повреждения ДНК Mec1p/Ddc2p фосфорилирует адапторную молекулу Rad9p по множественным мотивам S/T-Q. Фосфорилированный Rad9p привлекает Rad53p к месту повреждения FНА-зависимым способом. Доставка Rad53p к месту повреждения обеспечивает прямое фосфорилирование киназой Mec1 киназы Rad53, связанной с белком Rad9. Фосфорилирование множественных мотивов Rad53p обеспечивает возможность автофосфорилирования, завершающего переход киназы в активную форму [115, 118]. Автофосфорилирование Rad53p приводит к увеличению активности в 9 раз и зависит от концентрации киназы [106]. Повреждения ДНК вызывают олигомеризацию части молекул Rad53p *in vivo*. При низкой концентрации преинкубация Rad53p с комплексом Mec1p/Ddc2p вызывает активацию киназы Rad53. Гиперфосфорилированная активная киназа Rad53 освобождается от Rad9p, высвобождая его для следующих раундов активации киназы Rad53. Показано, что киназная активность Rad53p необходима для выполнения функции в чекпойнт-контроле [119, 120].

Индукцированная повреждениями ДНК модификация Rad53p в клетках, заблокированных в фазах G1 или G2, зависит от интактных ветвей RAD9 и RAD24/RAD17 чекпойнт-контроля, и эта модификация приводит к активации киназы Rad53 [121]. Кроме комплекса Rad24p/RFC обнаружен комплекс Elg1p/Rfc2-5p, необходимый как для репликации, так и для активации Rad53p при повреждении ДНК [122]. Этот комплекс необходим для процессинга застрявшей репликативной вилки и восстановления ДНК в S-фазе. Сверхпродукция Rad9p в клетках *rad24Δ* или сверхпродукция Rad24p в клетках *rad9Δ* не восстанавливает дефект модификации Rad53p при УФ-облучении, хотя G1/S-чекпойнт, транскрипционный ответ, G2/M-чекпойнт и выживаемость клеток в этих условиях восстанавливаются. По-видимому, в этих

условиях для фосфорилирования Rad53p необходимо наличие обоих белков Rad9 и Rad24 одновременно. Отсутствие фосфорилирования киназы Rad53 в клетках *rad24Δ* сверхэксперсирующих *RAD9* коррелирует с отсутствием киназной активности в этих клетках, показывая, что киназная активность Rad53p не является необходимой для функционирования чекпойнта в этих условиях. *MEC1*-зависимое фосфорилирование Rad53p при УФ-облучении в фазе G1 происходит в клетках *rad14Δ* в отсутствие *RAD9*, *RAD17*, *RAD24*, *MEC1* и *DDC1* [123]. Застрявшая репликативная вилка в отсутствие разрывов активирует Rad53p, Sgs1p-, Mrc1p-, Mec1p-зависимый путь. ДНР могут вызывать остановку репликативной вилки и активировать intra S-чекпойнт, в этом случае активация Rad53p происходит с участием Rad24- и Rad17-комплексов и геликазы Srs2 [124].

Белок Mrc1 (*mediator of the replication checkpoint*) опосредует активацию киназы Rad53 при блокировании репликации в ответ на истощение нуклеотидов или на наличие алкилированных повреждений [109,125]. Как и Rad9p, адапторный белок Mrc1 гиперфосфорилируется, но только в ответ на блок репликации. Белок содержит каноническую последовательность с несколькими SQ/TQ мотивами, которые являются сайтами фосфорилирования киназой Mec1 [126]. В отсутствие немедленного ответа у мутанта *mrc1* репликативный стресс вызывает повреждения ДНК, которые затем активируют адапторный белок Rad9 и чекпойнт, индуцированный повреждениями ДНК, с последующей активацией киназы Rad53. У мутанта *mrc1* в отсутствие Rad9p киназа Rad53 не активируется [109].

Активация киназы Rad53 фосфорилированным адапторным белком Mrc1, как и в случае Rad9p, может осуществляться посредством доставки киназы Rad53 к комплексу Mec1p/Ddc2p, обеспечивая прямое фосфорилирование или автофосфорилирование. Активированная киназа Rad53 в дальнейшем сама фосфорилирует адапторный белок Mrc1. По-видимому, таким способом обеспечивается дальнейшая активация киназы Rad53 в результате образовавшейся активационной петли. Мутации в сайтах фосфорилирования белка Mrc1 предотвращают фосфорилирование Mrc1p и блокируют активацию киназы Rad53, но не влияют на функцию адапторного белка Mrc1 в репликации.

Поскольку Mrc1p необходим для репликативного чекпойнта, а для репликации ДНК необходима загрузка Mrc1p на репликативную вилку, то нарушение регуляции загрузки Mrc1p на хроматин может объяснить, почему мутанты по многочисленным белкам репликации (Pol ϵ , Rfc5p, Dpb11p, Drc1p, Sgs1p) дефектны по репликативному чекпойнту [127–129]. Все белки имеют существенную функцию в репликации, но в каждом случае показано, что их роль в S-чекпойнте не зависит от их функции в репликации. Так, мутации ДНК-полимеразы ϵ , влияющие на чекпойнт, локализованы в С-концевом участке белка на большом расстоянии от каталитического домена, содержащего мотив «цинковые пальцы» (*zinc-finger*) связывания с ДНК [127]. Такие мутанты,

как, например, *dbf4*, по-видимому, не способны загружать Mrc1p на хроматин, и, как следствие, у них отсутствует способность Mrc1p передавать сигнал в случае нарушения репликации. Описано взаимодействие между фактором сборки хроматина Asf1 и киназой Rad53 [130]. Показано, что киназа Rad53 располагается на хроматине способом, зависящим от ДНК-геликазы Sgs1, функционирующей в S-чекпойнте [79]. Для активации чекпойнта при истощении пула нуклеотидов не нужна геликазная активность Sgs1p, а существенна способность связывания непосредственно с FNA1-Rad53p [124]. Геликазная активность Sgs1p совместно с топоизомеразой Top3 и белком Rad51 стабилизирует ДНК-полимеразу ϵ в застрявшей репликативной вилке. Sgs1p/Top3p функционируют параллельно с Mrc1p, хотя в отношении активации Rad53p мутации *sgs1* и *mrc1* эпистатичны. Таким образом, ключевые рецепторы стресса репликации доставляются к репликативной вилке самими репликативными белками. Другой мишенью киназы Mec1 является белок Esc4, необходимый для возобновления активности застрявшей репликативной вилки [131].

Адапторный белок Rad9 участвует в фосфорилировании и активировании двух киназ Rad53 и Chk1 [118, 132, 116] (рис. 1). Соответственно, белок Rad9 имеет два домена (рис. 2), активирующие различные сигнальные киназные пути независимо друг от друга [105]. В N-конце расположен домен CAD (*Chk1 activation domain*) фосфорилирования и активации киназы Chk1, необходимой для передачи сигнала в случае ареста деления клетки, индуцированного повреждениями в теломерном участке хромосом у мутантов *cdc13-1* и *yku70 Δ* , но не при индукции УФ-светом или ингибировании теломерной нуклеазы. Замена остатков, нарушающая индуцированное повреждениями ДНК фосфорилирование мотивов SQ и TQ белка Rad9, нарушает только Rad53p-опосредованный ответ, но не Chk1p-зависимый [116]. Киназа Chk1 не имеет FNA-доменов. По-видимому, адапторный белок Rad9 использует различные механизмы для регуляции активности киназ Rad53 и Chk1.

У неповрежденных клеток происходит регулируемое и зависимое от стадии клеточного цикла фосфорилирование белка Rad9 [115] и при возникновении повреждения ДНК гиперфосфорилирование киназами Tel1 и Mec1. Белок Rad9 имеет потенциальные сайты фосфорилирования киназой CDC28, контролирующей прохождение клеточного цикла [16]. Домен CAD не имеет сайтов фосфорилирования киназой Mec1, но имеет три потенциальных сайта фосфорилирования киназой CDC28. Предстоит выяснить, действительно ли CDC28-зависимое фосфорилирование регулирует сигнальный путь Rad9p-Chk1p. Отметим только, что потенциальные сайты фосфорилирования консервативны, и они обнаружены у ортологов белка Rad9.

Фосфорилирование Chk1p и Rad53p ведет к активации G1/S-, intra-S- или G2/M-чекпойнтов и к остановке клеточного цикла, а также к активации транскрипции генов репарации, репрессии транскрипции циклинов и ста-

билизации репликативных вилок (обзоры [133, 134]). Киназа Rad53 играет решающую роль на протяжении всего клеточного цикла в чекпойнт-контроле повреждений ДНК и репликативного блока [45], в то время как киназа Chk1 функционирует только в G2/M-фазе в ответе на повреждения ДНК [132]. Роль Chk1p в S-чекпойнте не показана, но косвенные данные указывают на возможность факультативной роли киназы Chk1 в отклике на блок репликации, а именно, клетки *dun1*, утратившие Chk1p, более чувствительны к НУ, чем ноль-мутанты *dun1* [135].

МИШЕНИ КИНАЗНОГО КАСКАДА

Мишенью киназы Chk1 является секурин Pds1, анафазный ингибитор сепаразы Esp1. Сепараза расщепляет когезин, скрепляющий хромосомы. Дегградация Pds1p осуществляется убиквитин-зависимым способом комплексом APC (*anaphase promoting complex*) [136]. Повреждение ДНК вызывает фосфорилирование Pds1p киназой Chk1, что предотвращает убиквитинирование и стабилизирует анафазный ингибитор Pds1. Накопление Pds1p блокирует прохождение клеточного цикла перед анафазой. Остановка зависит от обеих киназ, разрушение одного из генов *CHK1* или *RAD53* вызывает частичное замедление, и только нарушение обеих киназ приводит к полному отсутствию остановки [132]. Дальнейший анализ механизма индуцированной стабилизации Pds1p подтвердил, что Rad53p-зависимый путь регулирует взаимодействие Pds1p и Cdc20p (анафазо-специфический фактор APC-убиквитинлигазы), а фосфорилирование Pds1p киназой Chk1 ингибирует реакцию убиквитинирования [137]. Cdc20p является субстратом киназы CDC28 [16].

Киназы Mec1 и Rad53 необходимы для *intra* S-чекпойнта, участвуя в замедлении репликации при повреждении ДНК. Это замедление осуществляется в результате ингибирования работы ДНК-праймазы и поздних *ori*-репликаций. ДНК-праймаза также принимает участие в активации G1/S-чекпойнта [103, 138]. Активная киназа Rad53 фосфорилирует киназу Cdc7p/Dbf4p, необходимую для активации репликации, и ингибирует открытие поздних *ori*-репликации [139, 140]. Показано физическое взаимодействие между Dbf4p и Rad53p и ORC [139]. Киназа Cdc7 привлекается к *ori*-репликации белком Dbf4, который взаимодействует с ORC (*origin recognition complex*). Белки Dbf4, Orc1, Orc2, Orc6 являются субстратами киназы CDC28 [16]. Две субъединицы ДНК-полимеразы α (ДНК-праймазы) POL1 (p167 кДа) и POL12 (p86 кДа) фосфорилируются киназами CDC28 и CDC7 соответственно [141, 16]. Однако функциональное значение фосфорилирования этих белков мало изучено.

В киназном каскаде передачи сигнала участвует также другой субстрат киназы Rad53 — киназа Dun1. Киназа Dun1 участвует в активации генов

репарации в результате блока репликации или повреждения ДНК [142], в G2/M-чекпойнте [143,144] и индуцибельном фосфорилировании репарационного белка Rad55 [145]. Белок Rad55 фосфорилируется также киназой Rad53 [146]. Дигибридный анализ показал наличие физического взаимодействия между киназой Rad53 и белком Rad55, киназа Rad53 непосредственно фосфорилирует S14-Rad55. Киназа Dun1 относится к Chk2-семейству протеинкиназ, в число которых входит и киназа человека Chk2/huCds1. Эти киназы имеют, по крайней мере, один FHA-домен, который специфически связывается с фосфорилированным остатком аминокислоты, преимущественно фосфотреонином T(P). Домен FHA киназы Dun1 необходим для прямого фосфорилирования киназы Dun1 киназой Rad53 *in vitro* и *in vivo* и, по-видимому, участвует во взаимодействии между киназами Rad53 и Dun1 [145]. За активацию киназы ответственно фосфорилирование киназой Rad53 остатка T380 в активационной петле киназы Dun1 [147]. Показано, что соответствующий остаток T354 в активационной петле киназы Rad53 необходим для ее активации. По-видимому, фосфорилирование треонина в активационной петле является консервативным механизмом активации киназ Chk2-семейства.

Киназа Dun1 обеспечивает индуцированными повреждениями или репликативным стрессом синтез дезоксирибонуклеотидов посредством активации транскрипции генов рибонуклеотидредуктазы (RNR) [148] и инактивации ингибитора рибонуклеотидредуктазы Sm11 [149, 142]. RNR осуществляет катализ лимитирующей стадии синтеза дезоксирибонуклеотидов — превращение нуклеозиддифосфата в дезоксинуклеозиддифосфат. Активность RNR напрямую влияет на уровень и баланс пула нуклеотидов и регулируется в процессе репликации и репарации. Регуляция транскрипции генов *RNR* осуществляется с помощью корепрессора транскрипции Crt1p/Ssn6p/Tup1p. При блокировании репликации ДНК киназа Dun1 участвует в фосфорилировании субъединицы корепрессора транскрипции Crt1p, которое вызывает диссоциацию Crt1p с промотора, приводящую к дерепрессии транскрипции генов RNR [148].

Индукция транскрипции репарационных генов после повреждения ДНК осуществляется иным путем, включающим регуляторы транскрипции Swi4p и Swi6p. Непосредственной мишенью киназы Rad53 является транскрипционный фактор Swi6, участвующий в транскрипции некоторых индуцибельных генов в ответ на повреждения ДНК. Это приводит к задержке вступления клеток в S-фазу в результате ингибирования транскрипции циклинов CLN [150]. Таким образом, Swi6p является мишенью G1/S-остановки. Киназа Dun1 участвует в G2/M-чекпойнте, ингибируя деградацию циклина Clb2 и выход из митоза, блокируя активацию комплекса MEN (*mitotic exit network*) [143, 144].

Киназа Dun1 участвует в регуляции пострепликативной репарации [151]. Блок репликации индуцирует временное связывание киназы Dun1 с комплексом Pan2p/Pan3p, обеспечивая доступность и активирование киназой Dun1

комплекса Csr4p/Caf1p [151]. Комплексы Pan2p/Pan3p и Csr4p/Caf1p регулируют стабильность RAD5-мРНК. Поскольку ген *RAD5* относится к *RAD6*-группе генов пострепликативной репарации, Dun1p косвенно влияет на работу этого пути репарации. Rad6p имеет *RING-finger* домен, опосредующий взаимодействие K63-специфической убиквитинлигазы Ubc13 и Mms2p с Rad18p и K48-специфической убиквитинлигазой Rad6 [152]. Гетерокомплекс образует сигнал, активирующий репарацию ДНР путем HR (т. е. безошибочной, «*error-free*») вместо NHEJ (т. е. ошибочной, «*error-prone*») [152–154]. Участки поверхности белков, опосредующие взаимодействие Rad5p и Rad18p, могут опосредовать гомодимеризацию соответствующих субъединиц и вызывать диссоциацию пентамера на субкомплексы Rad5p/Ubc13p/Mms2p и Rad6p/Rad18p, которые и индуцируют Rad6p-зависимый сигнал для активации ошибочного пути [152].

Таким образом, мишенными процессами чекпойнт-ответа является регуляция экспрессии генов не только за счет контроля активации транскрипции [155], но и сотранскрипционной регуляции посттранскрипционных реакций процессинга 3'-конца мРНК и полиаденилирования [156]. Киназа Dun1 имеет помимо чекпойнт-функции остановки клеточного деления несколько дополнительных функций в репарации повреждений ДНК. К ним относятся: индукция транскрипции генов репарационных ферментов [148] и прямая модификация белков репарации, например фосфорилирование репарационного белка Rad55 [157] и компонента ДНК-лигазы IV белка Nej1 [158]. У белка Nej1 обнаружен сайт фосфорилирования киназой Dun1, мутация которого снижает эффективность NHEJ. Участники активации чекпойнт-контроля более или менее изучены, в то же время мишенные белки известны только в отдельных случаях, нуждаются в дальнейших исследованиях и являются предметом отдельного рассмотрения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Газиев А. И. // Радиационная биология. Радиоэкология. 1999. Т. 39. С. 630–638.
2. Глазер В. М., Глазунов А. В. // Генетика. 1999. Т. 35. С. 1449–1469.
3. Game J. C. // Mutation Res. 2000. V. 451. P. 277–293.
4. Королев В. Г. // Радиационная биология. Радиоэкология. 2007. В печ.
5. Hoeksta M. F., Demaggio A. J., Dhillon N. // TIG. 1991. V. 7. P. 256–261.
6. Hoeksta M. F., Demaggio A. J., Dhillon N. // TIG. 1991. V. 7. P. 293–297.
7. Гусев Н. Б. // Сорос. образовательный журнал. 2000. Т. 6. С. 4–12.
8. Gonzalez-Barrera S. et al. // Mol. Cell. 2003. V. 11. P. 1661–1671.
9. Ira G., Pellicioni A., Balijja A., et al. // Nature. 2004. V. 431. P. 1011–1017.
10. Aylon Y., Kupiec M. // Cell Cycle. 2005. V. 4. P. E61–E63.

11. *Mendenhall M. D., Hodge A. E. // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 1998. V. 62. P. 1191–1243.*
12. *Cross F. R. // Curr. Opin. Cell. Biol. 1995. V. 7. P. 790–797.*
13. *Nasmyth K. // Trends Genet. 1996. V. 12. P. 405–412.*
14. *Cross F.R. et al. // Mol. Biol. Cell. 2002. V. 13. P. 52–70.*
15. *Grandin N., Reed S. I. // Mol. Cell. Biol. 1993. V. 13. P. 2113–2125.*
16. *Ubersax J. A., Woodbury E. L., Quang P. N. et al. // Nature. 2003. V. 425. P. 859–864.*
17. *Deide S. J., Gottschling D. E // Curr. Biol. 2001. V. 11. P. 1336–1340.*
18. *Trujillo K. M., Roh D. H., Chen L. et al. // J. Biol. Chem. 2003. V. 278. P. 48957–48964.*
19. *Liberi G., Chiolo I., Pelliccioli A. et al. // EMBO J. 2000. V. 19. P. 5027–5038.*
20. *Grandin N., Charbonneau M. // Mol. Cell. Biol. 2003. V. 23. P. 9162–9177.*
21. *Chiolo I., Carotenuto W., Maffioletti G. et al. // Mol. Cell. Biol. 2005. V. 25. P. 5738–5751.*
22. *Tsukamoto Y., Mitsuoka C., Terasawa M. et al. // Mol. Biol. Cell. 2005. V. 16. P. 597–608.*
23. *Raymond W. E., Kleckner N. // Mol. Gen. Genet. 1993. V. 238. P. 390–400.*
24. *Frank-Vaillant M., Marcand S. // Genes Dev. 2001. V. 15. P. 3005–3012.*
25. *Valencia M. et al. // Nature. 2001. V. 414. P. 666–669.*
26. *Astrom S. U., Okamura S. M., Rine J. // Nature. 1999. V. 397. P. 310.*
27. *Lee S. E., Paques F., Sylvan J., Haber J. E. // Curr. Biol. 1999. V. 9. P. 767–770.*
28. *Clikeman J., Khalsa G., Baston S., Nickoloff J. // Genetics. 2001. V. 157. P. 579–589.*
29. *Tsukamoto Y., Kato J.-I., Ikeda H. // Nature. 1997. V. 388. P. 900–903.*
30. *Aboussekhra A., Chanet R., Zgaga Z. et al. // Nucleic Acids Res. 1989. V. 17. P. 7211–7219.*
31. *Aboussekhra A., Chanet R. et al. // Mol. Cell. Biol. 1992. V. 12. P. 3224–3234.*
32. *Koltovaya N. A., Arman I. P., Devin A. B. // Yeast. 1998. V. 14. P. 133–146.*
33. *Bartova I., Otyepka M., Kriz Z., Koca J. // Protein Science. 2004. V. 13. P. 1449–1457.*
34. *Холмуродов Х.Т., Кретов Д.А., Герасимова А.С., Колтовая Н.А. // Биофизика. 2006. Т. 51. С. 679–691.*
35. *Glaser V. M., Glasunov A. V., Tevzadze G. G. et al. // Curr. Genet. 1990. V. 18. P. 1–5.*
36. *De la Torre-Ruiz M., Lowndes N. F. // FEBS Lett. 2000. V. 485. P. 205–206.*
37. *Gunjan A., Verrault A. // Cell. 2003. V. 115. P. 537–549.*
38. *Колтовая Н.А., Девин А.Б. // Докл. РАН. 2002. Т. 387. С. 1–4.*
39. *Caspari T., Murray M. J., Carr A. M. // Genes Dev. 2000. V. 16. P. 1195–1208.*
40. *Esashi F., Yanagida M. // Mol. Cell. 1999. V. 4. P. 167–174.*
41. *Меун М.А., Holloway S. L. // Curr. Biol. 2000. V. 10. P. 1599–1602.*
42. *Pelliccioli A., Lucca C., Liberi G. et al. // EMBO J. 1999. V. 18. P. 6561–6572.*

43. Kondo T., Matsumoto K., Sugimoto K. // *Mol. Cell. Biol.* 1999. V. 19. P. 1136–1143.
44. Kaur R., Kostrub C. F., Enoch T. // *Mol. Biol. Cell.* 2001. V. 12. P. 3744–3758.
45. Longhese M. P. et al. // *EMBO J.* 1998. V. 17. P. 5525–5528.
46. Lindsey-Boltz L. A. et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2001. V. 98. P. 11236–11241.
47. Green C. M. et al. // *Curr. Biol.* 2000. V. 10. P. 39–42.
48. Ellison V., Stillman B. // *PloS Biol.* 2003. V. 1. E33.
49. Zou L., Liu D., Elledge S. J. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2003. V. 100. P. 13827–13832.
50. Majka J., Burgers P. M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2003. V. 100. P. 2249–2254.
51. Aylon Y., Kupiec M. // *Mol. Cell. Biol.* 2003. V. 23. P. 6585–6596.
52. Vaze M. B., Pellicoli A., Lee S. E. et al. // *Mol. Cell.* 2002. V. 10. P. 373–385.
53. Palmbos P. L., Daley J. M., Wilson T. E. // *Mol. Cell. Biol.* 2005. V. 25. P. 10782–10790.
54. Durocher D. et al. // *Mol. Cell.* 1999. V. 4. P. 387–394.
55. Liao H., Byeon I. J., Tsai M. D. // *J. Mol. Biol.* 1999. V. 294. P. 1041–1049.
56. Shima H., Suzuki M., Shinohara M. // *Genetics.* 2005. V. 170. P. 71–85.
57. Chen L., Trujillo K., Ramos W. et al. // *Mol. Cell.* 2001. V. 8. P. 1105–1115.
58. Martin S. G. et al. // *Cell.* 1999. V. 97. P. 621–633.
59. Hecht A. et al. // *Cell.* 1995. V. 80. P. 99–104.
60. Boulton S. J., Jackson S. P. // *EMBO J.* 1998. V. 17. P. 1819–1828.
61. Hegde V., Klein H. // *Nucleic Acids Res.* 2000. V. 28. P. 2779–2783.
62. Cervelli T., Galli A. // *Mol. Gene. Genet.* 2000. V. 264. P. 56–63.
63. DeFazin L. G. et al. // *EMBO J.* 2002. V. 21. P. 3192–3200.
64. Chan D. W., Lees-Miller S. P. // *J. Biol. Chem.* 1996. V. 271. P. 8936–8941.
65. Block W., Yu Y., Merkle D. et al. // *Nucleic Acids Res.* 2004. V. 32. P. 4351–4357.
66. Cui X., Yu Y., Gupta S. et al. // *Mol. Cell. Biol.* 2005. V. 25. P. 10842–10852.
67. Rouse J., Jackson S. P. // *Science.* 2002. V. 297. P. 547–551.
68. Garvik B., Carson M., Hartwell L. // *Mol. Cell. Biol.* 1995. V. 15. P. 6128–6138.
69. Melo J. A., Cohen J., Toczyski D. P. // *Genes Dev.* 2001. V. 15. P. 2809–2821.
70. Zou L., Elledge S. J. // *Science.* 2003. V. 300. P. 1542–1548.
71. D'Amours D., Jackson S. P. // *Genes. Dev.* 2001. V. 15. P. 2238–2249.
72. D'Amours D., Jackson S. P. // *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2002. V. 3. P. 317–327.
73. Grenon M., Gilbert C., Lowndes N. F. // *Nat. Cell. Biol.* 2001. V. 3. P. 844–847.
74. Usui T., Ogawa H., Petrini J. H. // *Mol. Cell.* 2001. V. 7. P. 1255–1266.
75. Sugawara N. et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2004. V. 101. P. 9315–9320.
76. Lisby M. et al. // *Cell.* 2004. V. 118. P. 699–713.
77. Barbour L., Xiao W. // *Mutation Res.* 2003. V. 532. P. 137–155.
78. Andrews C. A., Clarke D. J. // *Cell Cycle.* 2005. V. 4. P. 1073–1077.
79. Frei C., Gasser S. M. // *Genes Dev.* 2000. V. 14. P. 81–96.

80. *Toh G. W., Lowndes N. F.* // *Biochem. Soc. Trans.* 2003. V. 31. P. 242–246.
81. *Masumoto H. et al.* // *Nature.* 2005. V. 436. P. 294–298.
82. *Колтовая Н. А., Кадышевская Е. Ю.* // Докл. РАН. 1997. Т. 357. С. 710–712.
83. *Колтовая Н. А.* Диссертация на соискание степени д-ра биол. наук. Дубна: Объединенный институт ядерных исследований, 2006. 362 с.
84. *Clerici M. et al.* // *Mol. Cell. Biol.* 2004. V. 24. P. 10126–10144.
85. *Li X., Cai M.* // *Mol. Cell. Biol.* 1997. V. 17. P. 2723–2734.
86. *Devin A. B. et al.* // *Yeast.* 1990. V. 6. P. 231–243.
87. *Lee S. E., Moore J. K., Holmes A., et al.* // *Cell.* 1998. V. 94. P. 399–409.
88. *Gavin A. C., Aloy P., Grandi P., et al.* // *Nature.* 2006. V. 440. P. 631–636.
89. *Nakada D. et al.* // *Mol. Biol. Cell.* 2005. V. 16. P. 5227–5235.
90. *Carr A. M.* // *Curr. Opin. Genet. Dev.* 1997. V. 7. P. 93–98.
91. *Elledge S. J.* // *Science.* 1996. V. 274. P. 1664–1672.
92. *Keith C. T., Schreiber S. L.* // *Science.* 1995. V. 270. P. 50–51.
93. *Jackson S. P.* // *Curr. Opin. Genet. Dev.* 1996. V. 6. P. 19–25.
94. *Morrow D. M. et al.* // *Cell.* 1995. V. 82. P. 831–840.
95. *Nakada D. et al.* // *Nucleic Acids Res.* 2003. V. 31. P. 1715–1724.
96. *Sanchez Y. et al.* // *Science.* 1996. V. 271. P. 357–360.
97. *Menacho-Marquez M., Murguia J. R.* // *Cell Cycle.* 2006. V. 5. P. 2509–2516.
98. *Grenon M. et al.* // *FEMS Yeast Res.* 2006. V. 6. P. 836–847.
99. *Robinson J. G. et al.* // *J. Biol. Chem.* 2004. V. 279. P. 34802–34810.
100. *Brush G. S. et al.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1996. V. 93. P. 15075–15080.
101. *Brush G. S., Kelly T. J.* // *Nucleic Acids Res.* 2000. V. 28. P. 3725–3732.
102. *Bartrand A. J., Iyasu D., Brush G. S.* // *J. Biol. Chem.* 2004. V. 279. P. 2762–2767.
103. *Longhese M. P. et al.* // *Mol. Cell. Biol.* 1996. V. 16. P. 3235–3244.
104. *Kim H. S., Brill S. J.* // *DNA Repair (Amst.).* 2003. V. 2. P. 1321–1335.
105. *Blankley R. T., Lydall D.* // *J. Cell Sci.* 2004. V. 117(Pt 4). P. 601–608.
106. *Ma J. L. et al.* // *J. Biol. Chem.* 2006. V. 281. P. 3954–3963.
107. *Sweeney F. D., Yang F., Chi A. et al.* // *Curr. Biol.* 2005. V. 15. P. 1364–75.
108. *Sun Z., Hsiao J., Fay D. S., Stern D. F.* // *Science.* 1998. V. 281. P. 272–274.
109. *Alcasabas A. A., Osborn A. J., Bachant J. et al.* // *Nat. Cell. Biol.* 2001. V. 3. P. 958–965.
110. *Osborn A. J., Elledge S. J.* // *Genes Dev.* 2003. V. 17. P. 1755–1767.
111. *Van den Bosch M., Lowndes N. F.* // *Cell Cycle.* 2004. V. 3. P. 119–122.
112. *Soulier J., Lowndes N. F.* // *Curr. Biol.* 1999. V. 9. P. 551–554.
113. *Naiki T. et al.* // *Mol. Cell. Biol.* 2004. V. 24. P. 3277–3285.
114. *Emili A.* // *Mol. Cell.* 1998. V. 2. P. 183–189.
115. *Vialard J. E. et al.* // *EMBO J.* 1998. V. 17. P. 5679–5688.
116. *Schwartz M. F., Duong J. F., Sun Z. et al.* // *Mol. Cell.* 2002. V. 9. P. 1055–1065.

117. Leroy C., Lee S. E., Vase M. B. *et al.* // *Mol. Cell.* 2003. V. 11. P. 827–835.
118. Gilbert C. S., Green C. M., Lowndes N. F. // *Mol. Cell.* 2001. V. 8. P. 129–136.
119. Fay D. S., Sun Z., Stern D. F. // *Curr. Genet.* 1997. V. 31. P. 97–105.
120. Kim S., Weinert T. A. // *Yeast.* 1997. V. 13. P. 735–745.
121. De la Torre-Ruiz M. A., Green C. M., Lowndes N. F. // *EMBO J.* 1998. V. 17. P. 2687–2698.
122. Bellaoui M., Chang M., Ou J. *et al.* // *EMBO J.* 2003. V. 22. P. 4304–4313.
123. Neecke H., Lucchini G., Longdese M. P. // *EMBO J.* 1999. V. 18. P. 4485–4497.
124. Bjergbaek L. *et al.* // *EMBO J.* 2005. V. 24. P. 405–417.
125. Tanaka K., Russell P. // *Nat. Cell. Biol.* 2001. V. 3. P. 966–972.
126. Kim S. T. *et al.* // *J. Biol. Chem.* 1999. V. 274. P. 3738–3743.
127. Navas T. A., Zhou Z., Elledge S. // *Cell.* 1995. V. 80. P. 29–39.
128. Wang H., Elledge S. J. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1999. V. 96. P. 3824–3829.
129. Sugimoto K. *et al.* // *Mol. Cell. Biol.* 1997. V. 17. P. 5905–5914.
130. Hu F., Wang Y., Liu D. *et al.* // *Cell.* 2001. V. 107. P. 655–665.
131. Rouse J. // *EMBO J.* 2004. V. 23. P. 1188–1197.
132. Sanchez Y., Bachant J., Wang H. *et al.* // *Science.* 1999. V. 286. P. 1166–1171.
133. Chen Y., Sanchez Y. // *DNA Repair (Amst.).* 2004. V. 3. P. 1025–1032.
134. Weinert T. // *Curr. Opin. Genet. Dev.* 1998. V. 8. P. 185–93.
135. Schollaert K., Poisson J. M., Searle J. J. *et al.* // *Mol. Biol.* 2004. V. 15. P. 4051–4063.
136. Cohen-Fix O. *et al.* // *Genes Dev.* 1996. V. 10. P. 3081–3093 .
137. Agarwal R. *et al.* // *Mol. Biol. Cell.* 1999. V. 10. P. 45027–45033.
138. Marini F. *et al.* // *EMBO J.* 1997. V. 16. P. 639–650.
139. Duncker B. P. *et al.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2002. V. 99. P. 16087–16092.
140. Weinreich M., Stillman B. // *EMBO J.* 1999. V. 18. P. 5334–5346.
141. Ferrari M. *et al.* // *J. Biol. Chem.* 1996. V. 271. P. 8661–8666.
142. Zhou Z., Elledge S. J. // *Cell.* 1993. V. 75. P. 1119–1127.
143. Pati D. *et al.* // *Mol. Cell. Biol.* 1997. V. 17. P. 3037–3046.
144. Gardner R., Putnam C. W., Weinert T. // *EMBO J.* 1999. V. 18. P. 3173–3185.
145. Bashkirov V. I. *et al.* // *Mol. Cell. Biol.* 2003. V. 23. P. 1441–1452.
146. Herzberg K., Bashkirov V. I. *et al.* // *Mol. Cell. Biol.* 2006. V. 26. P. 8396–8409.
147. Chen S. H., Smolka M. B., Zhou H. // *J. Biol. Chem.* 2007. V. 282. P. 986–995.
148. Huang M., Zhou Z., Elledge S. J. // *Cell.* 1998. V. 94. P. 595–605.
149. Zhao X., Rothstein R. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2002. V. 99. P. 3746–3751.
150. Sidorova J. M., Breeden L. L. // *Genes Dev.* 1997. V. 11. P. 3032–3045.
151. Hammet A., Pike B. L., Heierhorst J. // *J. Biol. Chem.* 2002. V. 277. P. 22469–22474.
152. Ulrich H. D., Jentsch S. // *EMBO J.* 2000. V. 19. P. 3388–3397.
153. Xiao W. *et al.* // *Genetics.* 2000. V. 155. P. 1633–1641.

154. *Brusky J., Zhu Y., Xiao W. // Curr. Genet. 2000. V. 37. P. 168–174.*
155. *Zhou B. B., Elledge S. J. // Nature. 2000. V. 408. P. 433–439.*
156. *Kleiman F. E., Manley J. L. // Cell. 2001. V. 104. P. 743–753.*
157. *Bashkirov V. I., King J. S., Bashkirova E. V. et al. // Mol. Cell. Biol. 2000. V. 20. P. 4393–4404.*
158. *Ahnesorg P., Jackson S.P. // DNA Repair (Amsterdam). 2007. V. 6. P. 190–201.*

Получено 7 сентября 2007 г.

Редактор *М. И. Зарубина*

Подписано в печать 19.11.2007.

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

Усл. печ. л. 1,68. Уч.-изд. л. 2,03. Тираж 220 экз. Заказ № 55963.

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

E-mail: publish@jinr.ru

www.jinr.ru/publish/