

P19-2007-168

Е. Ю. Кадышевская, Н. А. Колтовая

УЧАСТИЕ ГЕНОВ *SRM5/CDC28*, *SRM8/NET1*, *SRM12/HFI1*
В АКТИВАЦИИ ЧЕКПОЙНТ-КОНТРОЛЯ У ДРОЖЖЕЙ
SACCHAROMYCES CEREVISIAE

Направлено в журнал «Генетика»

Кадышевская Е. Ю., Колтовая Н. А.

P19-2007-168

Участие генов *SRM5/CDC28*, *SRM8/NET1*, *SRM12/HF11*
в активации чекпойнт-контроля у дрожжей
Saccharomyces cerevisiae

У дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* выделено около двух десятков генов, участвующих в чекпойнт-контроле. В данной работе исследовалось участие в остановке клеточного цикла под действием повреждающих агентов генов *SRM*, которые выделены ранее как гены, влияющие на генетическую стабильность и радиочувствительность [1–3]. Показано, что мутации *srm5/cdc28-srm*, *srm8/net1-srm*, *srm12/hf11-srm* сокращают остановку клеточного цикла при повреждении ДНК и влияют на чекпойнт-остановку в фазах G0/S (*srm5*, *srm8*), G1/S (*srm5*, *srm8*, *srm12*), S (*srm5*, *srm12*) и G2/M (*srm5*). По-видимому, гены *CDC28/SRM5*, *HF11/ADA1/SRM12* и *NET1/SRM8* участвуют в формировании отклика клетки на повреждение ДНК и влияют на чекпойнт-регуляцию.

Работа выполнена в Лаборатории радиационной биологии ОИЯИ.

Препринт Объединенного института ядерных исследований. Дубна, 2007

Kadyshevskaya E. Yu., Koltovaya N. A.

P19-2007-168

SRM5/CDC28, *SRM8/NET1* and *SRM12/HF11* Genes Participates
in Activation of Checkpoints of Yeast *Saccharomyces Cerevisiae*

It's known about twenty checkpoint genes in yeast *Sacharomyces cerevisiae*. We are studying participation of *SRM* genes, selected as genes affecting genetic stability and radiosensitivity [1–3]. It was shown that *srm5/cdc28-srm*, *srm8/net1-srm*, *srm12/hf11-srm* mutations prevent checkpoint activation by DNA damage, particularly G0/S-checkpoint (*srm5*, *srm8*), G1/S-checkpoint (*srm5*, *srm8*, *srm12*), S-checkpoint (*srm5*, *srm12*) and G2-checkpoint (*srm5*). These data indicate, at least in budding yeast, *CDC28/SRM5*, *HF11/ADA1/SRM12* and *NET1/SRM8* genes mediate cellular response induced by DNA damage including checkpoint control.

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

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

ВВЕДЕНИЕ

Почкующиеся дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* служат удобной эукариотической модельной системой, для которой впервые была разработана концепция чекпойнт-регуляции и которая продолжает использоваться в многочисленных исследованиях этого механизма [4–5]. Дрожжи и другие эукариотические организмы имеют несколько точек проверки (чекпойнты), в которых контролируется правильность прохождения клеточного цикла и осуществляется остановка в ответ на повреждения ДНК или aberrантные структуры ДНК, возникающие в случае блокирования репликации ДНК. Чекпойнты, активирующиеся при возникновении повреждений ДНК в фазах G1 или G2, приводят к остановке клеточного цикла в этих же фазах [6]. Повреждения ДНК, возникающие в фазе S, приводят к замедлению репликации ДНК и к остановке в фазе G2. Замедление репликации ДНК является следствием комбинированного эффекта чекпойнт-независимого ингибирования движения репликативной вилки [7] и чекпойнт-зависимого ингибирования открывания сайтов начала репликации *ori* [8, 9]. Чекпойнт, вызывающий замедление репликации ДНК, называется *intra S*-чекпойнт [10, 11]. Второй, репликативный *S/M*-чекпойнт, функционирующий в фазе S, вызывает остановку клеточного цикла и супрессирует активацию поздних сайтов *ori*-репликации в ответ на блок репликации ДНК, например, гидроксимочевинной в результате истощения дезоксирибонуклеотидтрифосфатов (dNTP) [9, 12]. Этот сигнальный путь, *S*-чекпойнт, проверяет завершение репликации ДНК и предотвращает митоз до тех пор, пока репликация не закончится.

Функциональность чекпойнтов критична для предотвращения геномной нестабильности, вызванной повреждениями ДНК, так как чекпойнты осуществляют замедление или арест клеточного цикла в ответ на повреждения ДНК, обеспечивая возможность репарации [6, 11, 13, 14]. Чекпойнты также предотвращают спонтанную геномную нестабильность [15, 16]. Было показано, что именно дефекты репликативного чекпойнта и *intra S*-чекпойнта, но не G1- или G2-чекпойнтов вызывают увеличение уровня спонтанных геномных перестроек [15, 16]. Полученные результаты позволяют предположить, что к геномным перестройкам приводят ошибки репликации ДНК и что чекпойнты в фазе S супрессируют эти перестройки.

Хотя регуляция прохождения клеточного цикла наиболее хорошо изучена у дрожжей *S. cerevisiae*, но многие участники этого процесса еще не известны. Ранее нами было показано, что мутации в генах *CDC28*, *NET1* и *HFI1* сопровождаются падением митотической стабильности природных и рекомбинантных ядерных генетических структур и повышением чувствительности к летальному действию γ -излучения [1, 3]. Киназа *CDC28*, по-видимому, принимает участие в рекомбинационной репарации, поскольку уровень спонтанной геномной 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 геномной конверсии, так и кроссинговера [2, 17]. Кроме того, мутация *cdc28-srm*, умеренно влияющая на радиочувствительность клеток, повышает и без того высокую радиочувствительность мутанта *rad52* [2, 17]. Можно предположить, что киназа принимает участие также в минорном пути репарации ДНР ДНК и/или чекпойнт-регуляции. Анализ эпистатических взаимодействий мутаций этих генов в отношении радиочувствительности выявил принадлежность генов *CDC28* и *NET1* к одной *RAD9*-группе чекпойнт-контроля [2, 17–21]. Введение чекпойнт-мутации *rad53* в генотип двойного мутанта *cdc28-srm rad52* не приводит к дополнительному увеличению γ -чувствительности у тройного мутанта [21]. В настоящей работе косвенные генетические данные об участии гена *CDC28*, а также генов *NET1* и *HFI1* в чекпойнт-регуляции были подтверждены результатами прямого анализа задержки клеточного цикла после воздействия повреждающим агентом. Морфологические методы позволили выявить участие этих генов практически во всех чекпойнтах.

1. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Штаммы микроорганизмов. Все штаммы дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, использованные в данной работе, в том числе 711a (*MATa SRM⁺ ade2*), M1a (*MATa srm1 ade1*), M5a (*MATa srm5 ade1*), C3 (*MATa srm8 leu2 ade2*), 9a (*MATa srm12 ade2 leu2 ura3 trp1*), 3C (*MATa rad9::LEU2 ade2*), 1D (*MAT α rad17::URA3 ade2*), 16B (*MATa rad24::URA3 ade2*), 14 α (*MAT α srm12 ade2 leu2 ura3*), 12C (*MATa rad53 ade2*) — сконструированы совместно с д-ром А. Б. Девиным (ИМГ РАН, Москва) на генофоне штамма 71a [2]. Введение маркеров производилось с помощью генетических методов с использованием микроманипулятора. Сконструированные штаммы несут мутации *srm1*, *srm5/cdc28-srm* [1], *srm8/net1-srm* и *srm12/hfi1-srm* [3]. В качестве источника мутаций *rad9 Δ* , *rad17 Δ* , *rad24 Δ* и *rad53* служили штаммы: 7859-7-4a (*MATa rad9::LEU2 leu2-3,112 trp1-289 ura3-52 his7*), любезно присланный нам Prof. L. H. Hartwell (University of Washington, Seattle); SX46A *rad24 Δ* (*MATa rad24::URA3 ade2 his3-532 trp1-289 ura3-52*), SX46 *rad17 Δ*

(*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)*, полученные от Prof. W. Siede (University of Texas, Dallas). В качестве источника мутаций *cdc6-1* и *cdc9-1* служили штаммы 327A (*MATa cdc6-1 ade1 ade2 ura1 his7 lys2 tyr1 gal1*) и STX435-1-3B (*MATa cdc9-1 ade1 ade2 lys2 ura1 his7 leu1 gal1*), полученные от д-ра Ю. И. Павлова (СПГУ, С.-Петербург).

Среды и реактивы. Использовали стандартную полную питательную среду YPD [22] и полную среду БС, описанную ранее [1]. Синхронизацию культур осуществляли с помощью α -фактора *S. cerevisiae* (Peptide Institute, Inc). В работе использовали также гидроксимочевину (Sigma).

УФ-свет. Для облучения выращивали ночные культуры дрожжей в жидкой питательной среде YPD при 30 °С. Клетки разводили в воде, наносили на поверхность чашки с агаризованной средой БС из расчета 100 жизнеспособных клеток на чашку и облучали в темноте УФ-светом (лампа ДБ 30 w, мощность дозы 0,3 Дж/м²с). Облученные чашки помещали в пенал во избежание фотореактивации и вместе с контрольными чашками инкубировали в течение 5 сут при 30 °С.

Синхронизация культур в фазе G1 с помощью α -фактора. Гаплоидные клетки типа спаривания α синтезируют α -фактор, который выделяется в среду и оказывает влияние на клетки противоположного типа спаривания а. Под воздействием этого фактора клетки останавливаются на стадии инициации синтеза ДНК. α -фактор используют для синхронизации культур в фазе G1. Для этого гаплоидные культуры с генотипом *MATa* выращивали в течение ночи в жидкой питательной среде YPD до концентрации 2–5·10⁶ кл/мл (ранняя экспоненциальная культура) при 30 °С. Клетки осаждали центрифугированием (1500 g, 3 мин) и ресуспендировали до концентрации 3·10⁷ кл./мл в 1 мл свежей питательной среды YPD (pH 4,0), содержащей 5 мкг/мл α -фактора *S. cerevisiae*. После инкубации 1,5 ч при 30 °С добавляли вторую порцию α -фактора и инкубацию продолжали еще 1,5 ч. Степень синхронизации контролировали микроскопированием культуры, оценивая количество почкующихся клеток. Синхронизованные клетки имели характерную овальную форму.

УФ-облучение культур, синхронизованных в фазе G1, с помощью α -фактора. Синхронизованную α -фактором культуру осаждали центрифугированием (1500 g, 3 мин), отмывали в охлажденной воде и ресуспендировали в охлажденной воде до концентрации 2,5·10⁷ кл./мл. Культуру рассеивали на чашки Петри и немедленно облучали УФ-светом (см. УФ-облучение). Отметим, что для достижения аналогичного биологического эффекта при облучении клеток в суспензии требуются дозы примерно в три раза большие, чем при облучении на поверхности чашек. Используемые нами культуры не относятся к сильно комкующимся. Для снижения комкования и расхождения пар клеток в фазе G1 культуры обрабатывали ультразвуком с помощью Ultra-

sonic disintegrator (type UD-20) в течение 5–10 с в режиме 1. В результате расходуется большая часть слипшихся G1-клеток.

Появление клеток с малыми почками наблюдали под микроскопом (Carl Zeiss, Jena; увеличение 200×) и строили график доли почкующихся клеток в зависимости от времени после высвобождения от α -фактора. Для каждой точки просматривали, по крайней мере, 200 клеток. Существуют субъективные моменты оценки двойных клеток (клетка с большой почкой или две слипшихся клетки). Однако момент возникновения почки можно определить довольно точно, и получаются воспроизводимые результаты.

Обработка гидроксимочевинной. В асинхронную или синхронизованную α -фактором культуру клеток добавляли 2 М НУ до концентрации 0,2 или 0,5 М и инкубировали при температуре 30 °С в течение определенного времени. После соответствующего разведения высевали на питательную среду и инкубировали в течение 4 сут.

Остановка клеточного цикла под действием γ -облучения. Клетки растили в богатой питательной среде YPD до середины логарифмической фазы, обрабатывали ультразвуком, рассеивали на поверхность агаризованной среды и облучали на установке «Свет» (^{137}Cs), мощность дозы составляла 25 Гр/мин, малыми дозами γ -лучей (20 и 40 Гр), образующими небольшое количество двунитевых разрывов на клетку [4]. По морфологии микроколоний определяли остановку клеточного цикла после инкубации облученных культур в течение 10 ч и долю погибших клеток, определяемую спустя 24 ч после облучения.

Оценка скорости размножения клеток дрожжей. Клетки подращивали в жидкой среде YPD при 30 °С в условиях аэрации в течение ночи, разводили в свежей среде до первоначальной концентрации 10^5 – 10^6 кл./мл, вновь подращивали, встряхивая при 30 °С, до концентрации 10^7 – 10^8 кл./мл. Через определенные промежутки времени с помощью камеры Горяева устанавливали концентрацию клеток в растущей культуре. Линейный участок полученной кривой роста использовали для расчета величины времени генерации. Время генерации (τ) определялось по формуле

$$\tau = t/n, \quad n = \ln(N/N_0)/\ln 2,$$

τ — время генерации; t — время измерения; n — число генераций; N_0 , N — начальная и конечная концентрация клеток в культуре на линейном участке кривой роста (в полулогарифмическом масштабе).

Термоинактивация. Гаплоидные культуры выращивали ночь в жидкой питательной среде YPD до концентрации $1 \cdot 10^7$ кл./мл при 30 °С в условиях интенсивной аэрации, переносили на шейкер и инкубировали при 37 °С в течение определенного времени. После соответствующего разведения рассеивали на чашки БС и инкубировали в течение 5 сут при 30 °С.

Спонтанная rho⁻-мутабильность. Для определения частоты мутантов rho⁻ из моноспорных культур с помощью микроманипулятора изолировали отдельные клетки на агаровых блоках (по 5–6 клеток на блок) и инкубировали блоки в течение 5 сут. Выращенные колонии суспендировали в воде и в соответствующих разведениях высевали на БС. Рассевы инкубировали в течение 5 сут, затем определяли в них долю колоний rho⁻, которые идентифицировали по уменьшенным размерам и характерному изменению пигментации. Мутации дыхательной-недостаточности rho⁻ нарушают накопление красной пигментации в колониях *ade1*- или *ade2*-зависимых штаммов.

2. РЕЗУЛЬТАТЫ

*Влияние мутаций *srm* на остановку клеточного цикла в G0/S и G1/S под действием УФ-света*

У дрожжей *S. cerevisiae* появление почки служит морфологическим признаком прохождения через точку старта и вступления в раннюю стадию фазы S, легко наблюдается при микроскопировании. Определение во времени доли клеток с маленькими почками позволяет оценить вступление в фазу S синхронизированных клеток и возможную задержку деления.

Остановку в фазе G1/S под действием УФ-света изучали у клеток дикого типа 711a и радиочувствительных мутантов M5a (*srm5*), C3 (*srm8*) и 9a (*srm12*). Для сравнения продолжительности задержки клеточного цикла использовали мутант 3C (*rad9Δ*). Как хорошо известно, разрушение гена *RAD9* снимает остановку в фазе G1 [23]. Экспоненциально растущие культуры клеток а-типа спаривания синхронизовали в фазе G1 с помощью α-фактора (см. «Материалы и методы»). Синхронизованные культуры облучали УФ-светом на поверхности чашки. В этих условиях выживаемость клеток дикого типа при дозе облучения 33,6 Дж/м² составляла 74 %, для мутантов *srm5*, *srm8*, *srm12*, *rad9Δ* — 53, 38, 44, 20 % соответственно. После облучения клетки отмывали от α-фактора, ресуспензировали в свежей среде YPD и инкубировали при 30 °С в условиях интенсивной аэрации. Критерием выхода из фазы G1 и вступления клеток в фазу S служило появление почек. По данным литературы, возобновление клеточного цикла после прекращения действия α-фактора у облученных клеток дикого типа значительно замедлено, у мутанта *rad9Δ* эта задержка снижена [23–26].

На рис. 1, а приведены результаты анализа выхода клеток из фазы G1 у облученных и необлученных культур. Видно, что необлученные клетки дикого типа начинали делиться спустя 20 мин и достигали максимума через 40 мин после синхронизации α-фактором. Облученные в дозе 33,6 Дж/м² клетки начинали делиться через 30 мин и достигали максимума через 60 мин.

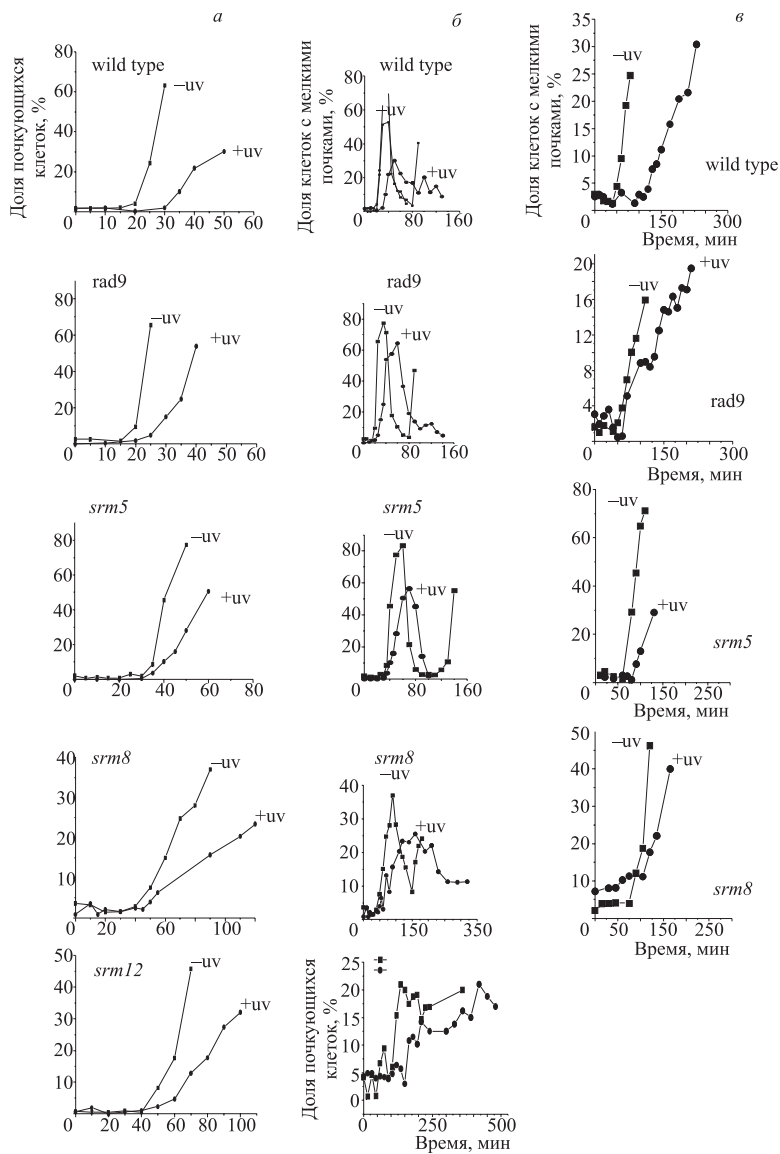


Рис. 1. Кинетика появления почкующихся клеток. а) Возобновление деления у необлученных и облученных УФ-светом (доза 33,6 Дж/м²) клеток разного генотипа, синхронизированных α-фактором в фазе G1. б) Кинетика появления почкующихся клеток после удаления α-фактора у облученных УФ-светом и необлученных культур разного генотипа. в) Появление почкующихся клеток у необлученных и облученных УФ-светом (33,6 Дж/м²) стационарных (G0) культур разного генотипа

Таким образом, при облучении УФ-светом задержка в фазе G1 составляла около 10 мин. У мутанта *rad9Δ* эта задержка составляла порядка 5 мин. Для мутантов *srm5*, *srm8* и *srm12* облученные и необлученные клетки начинали делиться практически одновременно. Облучение вызывает не только задержку возобновления почкования, но и замедляет кинетику почкования. Кривая не только сдвинута, но и наклон ее снижен для всех изученных штаммов. После облучения клетки всех генотипов делятся медленнее, но у мутантов эта разница меньше.

Длительность фазы S мы оценить не смогли в силу отсутствия нужного оборудования, но качественно оценили продолжительность времени генерации, используя кривую зависимости доли почкующихся клеток после УФ-облучения (рис. 1, б). Начало второй волны соответствует началу репликации во втором делении. Таким образом, время генерации можно оценить по интервалу времени между началом первого и второго почкования, хотя десинхронизация второго деления, вызванная облучением, усложняет оценку. Для необлученных культур штамма дикого типа количество почкующихся клеток быстро достигает максимума (примерно через 40 мин после освобождения от α -фактора), а затем быстро падает. Максимально достижимая величина 60–80 % зависит от степени почкования. Оценка времени генерации штаммов с различным генотипом приведена в табл. 1.

Для штамма дикого типа *SRM⁺* время генерации соответствовало 60 мин. Мутация *rad9Δ* практически не влияла на время генерации (65 мин), а мутации *srm5*, *srm8* и *srm12* увеличивали время генерации. Качественная картина для необлученных культур хорошо согласуется с данными, полученными из кинетики роста культуры в богатой питательной среде в оптимальных условиях роста (см. «Материалы и методы»). У облученных культур ширина пика больше и, соответственно, время генерации больше, чем у необлученных культур. Поскольку у облученных культур наблюдается десинхронизация, то точно определить начало репликации во втором делении этим методом не удалось, поэтому в табл. 1 указана недооценка времени генерации ($T + \Delta$). Ширина пика у облученных культур больше, чем у необлученных, можно предположить, что у всех штаммов продолжительность фазы S увеличена. Однако мутации *srm5* и *srm8* снижают эту задержку.

Помимо мониторинга появления почкующихся клеток после освобождения от блока в фазе G1 проводили также мониторинг и при облучении стационарных культур (G0). Для этого растили культуры в жидкой питательной среде в течение 36–48 ч в условиях интенсивной аэрации. На рис. 1, в приведены усредненные данные тестирования появления почкующихся клеток у штаммов разного генотипа *SRM⁺*, *rad9Δ*, *srm5*, *srm8*, *srm12*. Необлученные культуры начинали делиться спустя примерно 50 мин, облучение стационарных культур дикого типа вызывало более длительную задержку (~100 мин). У мутанта *rad9Δ* задержка практически отсутствовала, а у мутантов *srm5*

Таблица 1. Влияние УФ-облучения (доза 33,6 Дж/м²) на кинетику появления почки в синхронизированных культурах клеток разного генотипа

Генотип	Метод синхронизации	Время появления почкующихся клеток, мин		Задержка, вызванная повреждениями ДНК, мин	Первое деление ^а , мин		Время генерации ^б , мин
		-УФ	+УФ		-УФ	+УФ	
<i>SRM</i> ⁺	G0	52,0±3,7	102,5±8,5	50	70	—	—
<i>rad9</i>	G0	53,3±6,7	70±10	17	80	—	—
<i>srm5</i>	G0	56,7±3,3	75±5	18	120	—	—
<i>srm8</i>	G0	75,0±0	75±0	0	> 120	—	—
<i>srm12</i>	G0	90,0±0	141,7±4,4	52	> 300	—	—
<i>SRM</i> ⁺	α -фактор	15	30	15	53	110+ Δ	73
<i>rad9</i>	α -фактор	15	20	5	63	90	—
<i>srm5</i>	α -фактор	30	30	0	80	70+ Δ	86
<i>srm8</i>	α -фактор	40	60	20	130	275+ Δ	181
<i>srm12</i>	α -фактор	40	50	10	—	—	—

^а Величина времени генерации определялась из кинетики появления почки у культур синхронизированных α -фактором в фазе G1; ^б время генерации определяли стандартным способом по наклону линейного участка кривой роста культуры в жидкой питательной среде YPD (Difco) в условиях интенсивной аэрации при 30 °С

и *srm8* задержка была меньше, чем у клеток дикого типа. Мутации *srm8* и *srm12* сильно увеличивали время генерации, мутанты начинали делиться значительно позже, и наклон кривой был различным для облученных и необлученных культур. У облученных культур наблюдалось замедленное нарастания доли почкующихся клеток.

Полученные данные для культур, синхронизированных разными способами (G0 и G1), суммированы в табл. 1. Видно, что происходит снижение задержки в фазе G1 у мутантов *srm5*, *srm8* и *srm12* и в фазе G0 у мутантов *srm5* и *srm8*. Мутации *srm5* и *srm8*, по-видимому, влияют также на *intra S*-чекпойнт, замедляющий синтез ДНК.

Участие генов SRM8 и SRM12 в остановке клеточного цикла в фазе S под действием гидроксимочевины

Гидроксимочевина (HU) ингибирует фермент рибонуклеотидредуктазу и приводит к неспособности синтезировать дезоксирибонуклеотиды и блоку синтеза ДНК. Клетки дикого типа в присутствии HU обратимо останавливают деление в фазе S, активируя репликативный S-чекпойнт [27]. Мутации

по S-чекпойнту должны проявлять чувствительность к HU, поскольку неспособность задерживать деление может привести к митозу в условиях незавершенного синтеза ДНК.

Для определения чувствительности клеток к HU использовали качественный тест, нанося репликатором клетки на поверхность среды с добавлением 0,2 М HU и инкубируя в течение 2 сут. Помимо мутаций *srm* для сравнения анализировали также мутации в известных чекпойнт-генах *rad9Δ*, *rad17Δ*, *rad24Δ* и *rad53*. Результаты тестирования гаплоидных штаммов 711a (*SRM⁺*), M1a (*srm1*), M5a (*srm5*), C3 (*srm8*), 9a (*srm12*), 12C (*rad53*), 16B (*rad24Δ*), 1D (*rad17Δ*), 3C (*rad9Δ*) приведены на рис. 2, а. В присутствии 0,2 М HU клетки дикого типа растут, что согласуется с данными других авторов [28]. Мутации *rad53*, *srm8* и *srm12* повышают чувствительность к HU в условиях роста на среде с 0,2 М HU. Мутации можно выстроить в ряд по мере возрастания чувствительности к HU:

$$SRM^+ < srm5 < rad9 < srm1 < rad24 < srm8 < rad17 < srm12 < rad53.$$

Однако чувствительность к HU может быть обусловлена не мутациями *srm*, а другими факторами, локализованными в этих штаммах. Для проверки влияния мутаций *srm8* и *srm12* на чувствительность к HU получили тетрады постмейотических потомков гибридов *SRM⁺ × srm8* и *SRM⁺ × srm12*. Так как мутация *srm8* является температурочувствительной, мутантные клоны *srm8* легко тестировать при сравнении реплик, инкубированных при 30 и 37 °С (рис. 2, б). Сегреганты *srm12* отличаются от клеток дикого типа медленным ростом. Сравнение отпечатков клонов на средах БС и БС + 0,2 М HU демонстрирует расщепление по чувствительности к HU в отношении 2 : 2, причем чувствительность к HU коррелирует с присутствием в клетках мутаций *srm8* или *srm12*.

Для количественной оценки чувствительности к летальному действию HU использовали гаплоидные штаммы а-типа спаривания 711a (*SRM⁺*), M5a (*srm5*), C3 (*srm8*), 9a (*srm12*), 3C (*rad9Δ*), 12C (*rad53*). Обработка растущей культуры HU приводит к их синхронизации в фазе S (0,2 М HU, 150 мин), у чекпойнт-мутантов такой синхронизации не происходит. Анализ кинетики летального действия 0,2 М HU на асинхронные культуры мутантных клеток показал, что только мутация *rad53* влияет на чувствительность к летальному действию 0,2 М HU (рис. 2, в). У штаммов дикого типа остановка деления продолжается в течение 6 ч, затем клетки начинают делиться. В этих условиях мутации *srm5* и *srm12* не влияли на чувствительность к HU. Однако синхронизация культуры клеток α-фактором в фазе G1 и повышение концентрации до 0,5 М HU выявило влияние мутации *srm12* на чувствительность к летальному действию HU (рис. 2, в).

Однако остановка деления клеток в присутствии HU не эквивалентна HU-индуцированной гибели [27]. Из рис. 4 видно, что клетки дикого типа

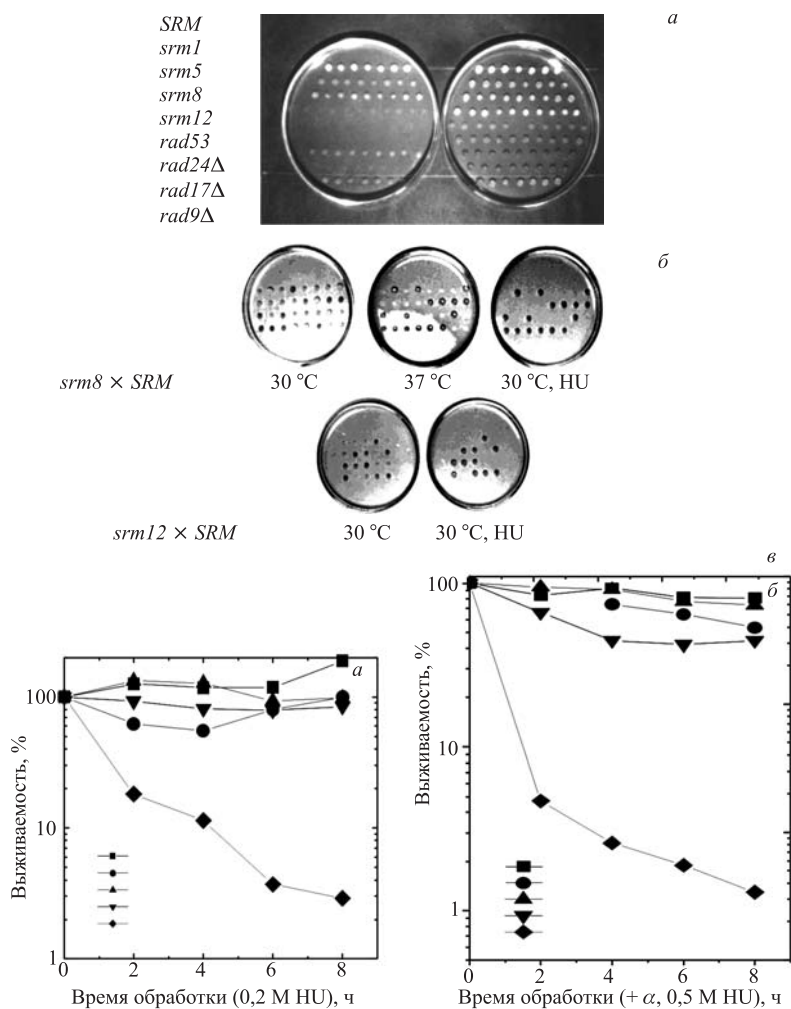


Рис. 2. Чувствительность клеток к гидроксимочевине. *а*) Отпечатки клеток разного генотипа (1-й ряд — *SRM*⁺, 2-й ряд — *srm1*, 3-й ряд — *srm5*, 4-й ряд — *srm8*, 5-й ряд — *srm12*, 6-й ряд — *rad53*, 7-й ряд — *rad24Δ*, 8-й ряд — *rad17Δ*, 9-й ряд — *rad9Δ*) на чашках со средами БС+0,2 М НУ (слева) и БС (справа). *б*) Тетрады, полученные от гибридов *SRM*⁺ × *srm8* (вверху) и *SRM*⁺ × *srm12* (внизу), перенесены репликатором на среды БС (30 и 37 °С) и БС+0,2 М НУ. *в*) Чувствительность клеток разного генотипа к летальному действию НУ. Клетки выращивали в питательной среде, переносили в свежую питательную среду с 0,2 М НУ, через определенные промежутки времени отмывали от НУ и рассевали на питательную среду (слева). Перед обработкой 0,5 М НУ клетки синхронизовали α-фактором в фазе G1 (справа)

и мутанта *srm5* способны расти в присутствии 0,2 М НУ. Ингибирование деления наблюдается лишь в течение нескольких часов (рис. 2, в), потом происходит адаптация, и клетки начинают делиться. Использование метода микроколоний позволяет определить влияние мутаций *srm* на задержку деления под действием НУ. Арест клеток оценивали при обработке клеток 0,2 М НУ в течение 4 ч. В табл. 2 приведены результаты трех экспериментов.

Таблица 2. Арест и гибель клеток разного генотипа под действием 0,2 М гидроксимочевины (4 ч)

Гено-тип	НУ 0,2М	I ^a		II		III		Арест ^г , %	Леталь-ность ^д , %
		1-6 ^б	> 6	1-6	> 6	1-6	> 6		
<i>rad53</i>	—	42,7 ^в	57,3	32,2	67,8	37,3	62,7	37,4±5,3	—
	+	84,8	15,2	87,8	12,2	83,7	16,3	85,4±2,1	93,0±4,4
SRM ⁺	—	29,1	70,9	24,6	75,4	22,0	78,0	25,2±3,6	—
	+	39,7	60,3	37,4	62,6	34,2	65,8	37,1±2,8	3,4±3,4
<i>srm5</i>	—	27,0	73,0	32,3	67,7	29,8	70,2	29,7±2,7	—
	+	30,6	69,4	36,1	63,9	27,6	72,4	31,4±4,3	35,1±9,6
<i>srm12</i>	—	31,4	68,6	32,1	67,9	31,3	68,7	31,6±0,4	—
	+	41,8	58,2	22,2	77,8	30,1	69,9	31,4±9,9	37,1±18,3

^a номер эксперимента; ^б количество клеток в микроколонии; ^в количество (%) микроколоний данного размера; ^г доля микроколоний размером 1-6 клеток; ^д определяли из кривых выживаемости при обработке 0,2 М НУ (4 ч)

Видно, что у мутанта *rad53* 0,2 М НУ вызывает накопление колоний размером 1-6 клеток. Сопоставление с летальностью показывает, что это погибшие клетки, т. е. полностью отсутствует задержка. Таким образом, выживание клеток *rad53* в присутствии НУ вызывает быструю гибель клеток. Показано, что при этом накапливаются почкующиеся клетки, содержащие митотическое веретено и G1-ДНК [27]. У клеток дикого типа количество микроколоний (1-6 клеток) выше в присутствии НУ. Это превышение может быть обусловлено суммарным эффектом обратимой и необратимой остановки клеточного цикла. Показано, что большая часть синтеза ДНК может эффективно восстанавливаться после НУ-ингибирования [27]. У мутантов *srm5* и *srm12* клетки делятся одинаково вне зависимости от присутствия НУ. У штамма дикого типа клетки в микроколониях в большинстве своем способны обратимо делиться, у мутантов же *srm5* и *srm12* рост микроколоний блокирован необратимо. Летальный эффект мутаций *srm5* и *srm12* меньше, чем у мутанта *rad53*, величина которого хорошо согласуется с ранее полу-

ченными данными (рис. 2, в). У мутантов отсутствует обратимая компонента, по-видимому, мутации нарушают остановку деления в присутствии HU и тем самым приводят к повышению летального эффекта.

Поскольку тимидиновые димеры, индуцированные под действием УФ-света, также вызывают блок репликации [28], мы изучали способность мутаций *srm* опосредовать выживаемость в ответ на облучение УФ-светом. Из рис. 3 видно, что мутации *srm5* и *srm8* повышают чувствительность клеток к УФ-свету по сравнению с клетками дикого типа. Мутация *srm12* не влияет на УФ-чувствительность гаплоидных штаммов (данные не приведены). Эти данные косвенным образом подтверждают, что гены *SRM5/CDC28* и *SRM8/NET1* важны для поддержания выживаемости в условиях репликативного стресса.

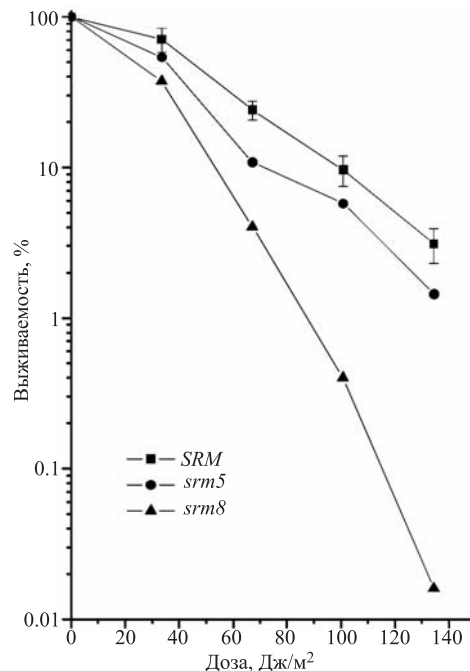


Рис. 3. Чувствительность клеток разного генотипа к летальному действию УФ-света. Приведены типичные кривые выживания

Ген CDC28 необходим для остановки клеточного цикла репликативных мутантов cdc9-1 и cdc6-1 в фазе G2 при повреждении ДНК в условиях рестриктивной температуры

Существует класс температурочувствительных мутантов *cdc*, которые останавливают деление клеток в фазе G2 при рестриктивной температуре. Они

кодируют продукты, участвующие в метаболизме ДНК (*cdc9*, ДНК-лигаза; *cdc6*, компонент пререпликативного комплекса; *cdc13*, белок, участвующий в репликации теломер). Ранее было показано, что остановка клеточного цикла у этих мутантов при непермиссивной температуре зависит от чекпойнт-генов [29]. Так клетки температурочувствительного мутанта *cdc9*, кодирующего ДНК-лигазу, останавливаются в фазе G2 с завершённым синтезом ДНК, но с несшитыми фрагментами Оказаки [30]. Временная инактивация ДНК-лигазы не летальна для большинства клеток, *cdc9*-мутантные клетки сохраняют выживаемость после краткой инкубации при рестриктивной температуре. Однако при рестриктивной температуре в отсутствие *RAD9* дефектные по ДНК-лигазе клетки быстро гибнут, поскольку вступают в митоз с поврежденными молекулами ДНК.

Для анализа функциональности G2-чекпойнта у мутанта *srm5* (*cdc28-srm*) мы использовали две мутации *cdc* — *cdc9-1* и *cdc6-1*. Мутации *cdc6-1* и *cdc9-1* ввели в генотип штамма 71a, а затем были сконструированы двойные мутанты *cdc9-1 srm5* и *cdc6-1 srm5*. Анализировали гаплоидных постмейотических потомков зигот *cdc9-1 srm5* × *cdc9-1 SRM5* и *cdc6-1 srm5* × *cdc6-1 SRM5*. Присутствие мутации *srm5* устанавливали с помощью микрокопирования клеток. Клетки, несущие мутацию *srm5*, имеют характерную овальную форму, в отличие от круглых клеток сегрегантов *cdc6-1 SRM5* и *cdc9-1 SRM5*.

Результаты качественного анализа термочувствительности сегрегантов из 5 тетрад зиготы *cdc9-1 srm5* × *cdc9-1 SRM5* приведены на рис. 4. В каждой тетраде двум отпечаткам, содержащим после выдерживания при 37 °С лишь несколько жизнеспособных клеток или вообще не содержащим таковых, соответствовал генотип *cdc9-1 srm5*. Таким образом, мутация *srm5* существенно усиливает термоинактивацию клеток *cdc9-1*.

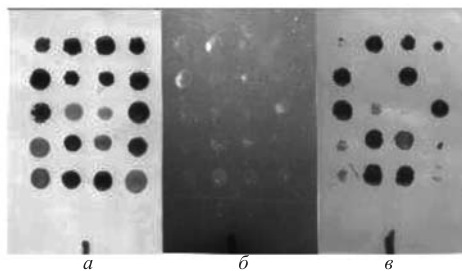


Рис. 4. Влияние мутации *srm5* на термоинактивацию клеток *cdc9-1*. Тетрады, полученные от диплоида *cdc9-1/cdc9-1 srm5/SRM5*, переносили репликатором на среду БС. Отпечатки инкубировали 2 сут либо при 30 °С (а), либо 2 сут при 37 °С (б), либо 2 сут при 37 °С, затем 3 сут при 30 °С (в)

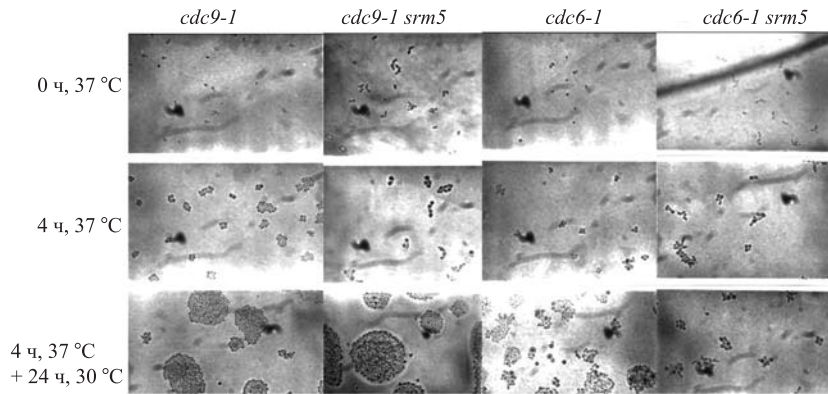
Количественная оценка летального действия повышенной температуры определялась при длительном культивировании немутантного и мутантных

штаммов при повышенной температуре. Мутация *srm5/cdc28-srm* отличается от прочих описанных в литературе аллелей *cdc28* тем, что при повышенной температуре (37 °С) она не вызывает полной инактивации функции белка Cdc28 и соответственно остановки клеточного цикла, но увеличивает время генерации. Спустя 24 ч инкубации при 37 °С титр жизнеспособных клеток вырос на порядок. Мутация *cdc9-1* ингибирует деление клеток и идуцирует гибель клеток при инкубации в условиях повышенной температуры. На рис. 5, б приведены результаты инкубации одиночных *cdc9-1* и двойных *cdc9-1 srm5* мутантов при непермиссивной температуре (37 °С). Кинетика инактивации клеток при культивировании при непермиссивной температуре 37 °С в течение нескольких часов наглядно показывает, что в этих условиях двойной мутант *cdc9-1 srm5* проявляет повышенную термочувствительность. Двойные мутанты *cdc6-1 srm5* более чувствительны к инкубации при повышенной температуре, чем одиночные мутанты *cdc6-1* (рис. 5, б). Эффект мутаций *srm5* в данном случае выражен более сильно. Инактивация мутантных клеток *cdc6-1 srm5* происходит быстрее, чем клеток *cdc9-1 srm5*.

Для оценки задержки клеточного цикла у температурочувствительных мутантов анализировали образование микроколонии. Для этого клетки *cdc9-1* и *cdc9-1 srm5*, выращенные при пермиссивной температуре, рассеивали на поверхность агаризованной среды и выдерживали при рестриктивной температуре (37 °С) в течение 4 ч. Затем чашки помещали в пермиссивные условия (28 °С) и через 24 ч определяли долю клеток, способных образовывать микроколонии. На рис. 5, а приведены фотографии микроколоний. Видно, что рестриктивная температура у мутанта *cdc9-1* подавляет рост не всех клеток, но действует более эффективно на клетки одиночного мутанта *cdc9-1*, чем двойного мутанта *cdc9-1 srm5*. Через 24 ч инкубации при пермиссивной температуре 28 °С образуются микроколонии. В табл. 3 приведены результаты количественного анализа жизнеспособности клеток одиночных и двойных мутантов *cdc9-1 srm5*. Видно, что двойные мутанты более чувствительны к температуре. На рис. 5, а приведены фотографии микроколоний мутантов *cdc6-1* и *cdc6-1 srm5*. Видно, что мутация *cdc6-1* лучше ингибирует деление клеток, чем мутация *cdc9-1*. У двойного мутанта 4 ч инкубации при рестриктивной температуре также ингибируют деление клеток. Спустя 24 ч инкубации при пермиссивной температуре 28 °С мутанты *cdc6-1* образуют микроколонии, у двойного мутанта *cdc6-1 srm5* образование микроколоний снижено. В табл. 3 приведены результаты количественного анализа микроколоний для одиночного *cdc6-1* и двойного *cdc6-1 srm5* мутантов. Видно, что двойной мутант *cdc6-1 srm5* более чувствителен к температуре.

Полученные результаты показывают, что ген *SRM5/CDC28* необходим для остановки в фазе G2 при повреждениях ДНК, образующихся в результате нарушения процесса репликации ДНК, т. е. участвует в G2-чекпойнте.

a



b

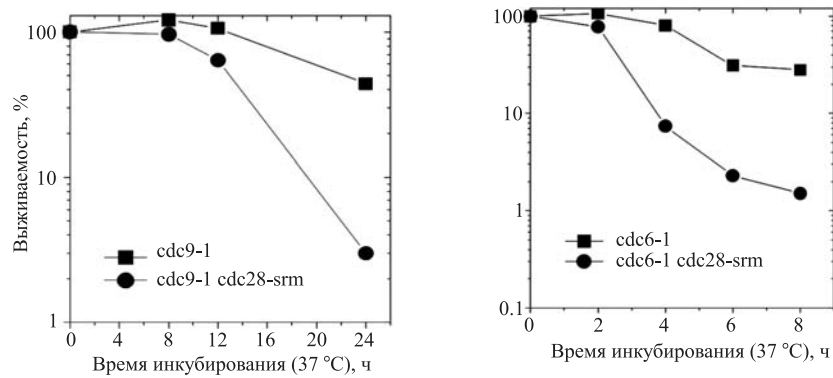


Рис. 5. а) Арест и выживаемость клеток *cdc9-1*, *cdc9-1 srm5*, *cdc6-1* и *cdc6-1 srm5*. Каждая микроколлония образована отдельной клеткой. Клетки сфотографированы при одном и том же увеличении (200×) сразу же после посева, спустя 4 ч выдерживания при рестриктивной температуре 37 °C и через 24 ч инкубирования при перmissive температуре 28 °C. б) Влияние мутации *srm5* на термоинактивацию клеток *cdc9-1* и *cdc6-1*. Одиночные (*cdc9-1*, *cdc6-1*) и двойные (*cdc9-1 srm5*, *cdc6-1 srm5*) мутанты, выросшие при 28 °C, ограниченное время содержали в условиях рестриктивной температуры (37 °C), а затем посева на чашки, которые инкубировали при перmissive температуре (28 °C). Клетки одиночного мутанта *srm5* не чувствительны к температуре и продолжали делиться в данных условиях (кривая не приведена)

Таблица 3. Арест и гибель клеток разного генотипа под действием рестриктивной температуры

Генотип	T, °C	I ^a			II			III			Арест ^г , %	Выживаемость ^д , %
		1-2 ^б	1-4	S	1-2	1-4	S	1-2	1-4	S		
<i>cdc9-1</i>	25	—	—	—	21	41	91	2	35	96	45.7	93.5±2.5
	37	60 ^б	73	81	7	16	93	22	48	88		87.3±3.5
<i>cdc9-1</i> <i>srm5</i>	25	—	—	—	35	75	80	91	95	90	74.0	85.0±5.0
	37	38	56	48	24	73	80	59	93	75		73.7±13.3
<i>cdc6-1</i>	25	—	—	—	12	56	94	39	80	87	79.3	90.5±3.5
	37	25	83	52	35	69	48	28	86	51		50.3±1.2
<i>cdc6-1</i> <i>srm5</i>	25	—	—	—	4	57	96	20	70	91	81.3	93.5±2.5
	37	53	85	5	6	77	19	13	82	12		12.0±4.0

^a номер эксперимента; ^б количество клеток в микроколонии; ^в количество колоний данного размера; ^г доля (%) микроколоний через 4 ч инкубации при 30 °C; ^д доля (%) выживших клеток, определялась через 24 ч

Остановка в фазе G2 при повреждении ДНК под действием γ -излучения

Известно, что у облученных клеток дрожжей наблюдается длительная остановка в фазе G2, в процессе которой осуществляется репарация подавляющей части повреждений ДНК. Поскольку мутации *srm5*, *srm8* и *srm12* повышают чувствительность к γ -излучению [2, 3], интересно было выяснить, не связано ли это повышение чувствительности с нарушением G2-чекпойнта. Для этого анализировали остановку клеточного цикла, вызванную повреждениями ДНК под действием γ -излучения. Для сравнения эффектов на G2-чекпойнт в работе также использовали мутацию *rad9Δ*, заведомо нарушающую G2-чекпойнт [31]. Гаплоидные асинхронные культуры штаммов разного генотипа облучали и анализировали кинетику роста микроколоний. На рис. 6 представлена зависимость размера микроколоний от времени пострадиационной инкубации. Видно, что необлученные клетки дикого типа (одиночные и с почкой) через 2 ч в основном уже поделились и образуют колонии из 2–4 клеток, через 5 ч прошла еще одна генерация (рис. 6, а). Через 10 ч картина практически совпадает с 24-часовой картиной. При облучении (доза 20 Гр) через 2 и 5 ч после облучения заметная доля клеток еще не поделилась. Наблюдается задержка деления. У мутанта *rad9Δ* задержка почти не наблюдается (рис. 6, б). На 2 ч картина практически как у необлученных клеток, и только на 5 ч наблюдается некоторая задержка. Мутация *srm5* не влияет заметным образом на задержку деления после облучения (рис. 6, в). Для мутаций *srm8* и *srm12* в первые два часа картина такая же, как и для необлученных клеток, поскольку время генерации у мутантов *srm8* и *srm12*

увеличено (рис. б, г и д). Однако на 10 ч наблюдается значительное число микроколоний размером до 9 клеток, в то время как для клеток дикого типа уже все колонии размером больше 15 клеток. Зато на 5 и 10 ч видна задержка деления. Увеличение дозы облучения до 40 Гр не приводит к увеличению задержки деления.

Для количественной характеристики остановки клеточного цикла можно использовать отношение доли остановившихся клеток (микроколонии, превратившие свой рост на стадии клетки с большой почкой, либо две соседние клетки с большими почками) к доле погибших клеток. Для клеток дикого типа этот параметр соответствует 1,0, потому что практически все клетки с нерепарируемыми повреждениями ДНК гибнут и останавливаются в фазе G2. Гаплоидные клетки в фазе G1 или в стадии постанафазы при γ -облучении не могут репарировать двуниевые разрывы, останавливаются в последующей фазе G2 и гибнут, при этом они представлены клетками с большой почкой или двумя соседними клетками с большими почками соответственно. Клетки дикого типа, способные репарировать двуниевые разрывы (клетки в фазах S и G2) образуют большие микроколонии, которые не учитываются. Наоборот, клетки чекпойнт-мутантов, которые гибнут под действием γ -облучения, обычно не останавливаются немедленно, чаще они продолжают делиться в течение нескольких генераций. Поэтому у нормальных по чекпойнт-контролю штаммов отношение арестованных к нежизнеспособным клеткам составляет величину $> 0,8$, а у чекпойнт-мутантов $\ll 1,0$ и составляет обычно величину $< 0,3$ [29]. Гибель облученных клеток приписывается нерепарируемым повреждениям ДНК, хотя возможно обусловлена не только дефектом ареста. Метрическую характеристику остановки клеточного цикла определяли как долю микроколоний, состоящих из 2 (1 клетка с большой почкой) или 4 (2 клетки с большими почками) клеток спустя 10 ч после облучения и посева. Летальность определяли как долю микроколоний спустя 24 ч после облучения. В табл. 4 приведены результаты трех экспериментов. Видно, что только мутация *rad9 Δ* влияет на остановку клеточного цикла в G2 после γ -облучения, у мутантов *srm5*, *srm8* и *srm12* не удалось данным методом выявить нарушения G2-чекпойнта, контролирующего остановку клеточного цикла при повреждении ДНК под действием γ -облучения.

Влияние checkpoint-генов на мутабельность митохондриального генома

Фенотипические проявления генов *CDC28*, *NET1*, *HFI1* схожи с фенотипическими проявлениями чекпойнт-генов. Для мутантов по репликативному чекпойнту характерна генетическая нестабильность [15, 16]. Ранее нами было показано, что гены *CDC28*, *NET1*, *HFI1* принимают участие в стабилизации различных генетических структур, таких как природные хромосомы и рекомбинантные структуры [1, 3]. Мутации в этих генах приводят к повышению частоты утраты хромосом. В отношении митохондриального генома

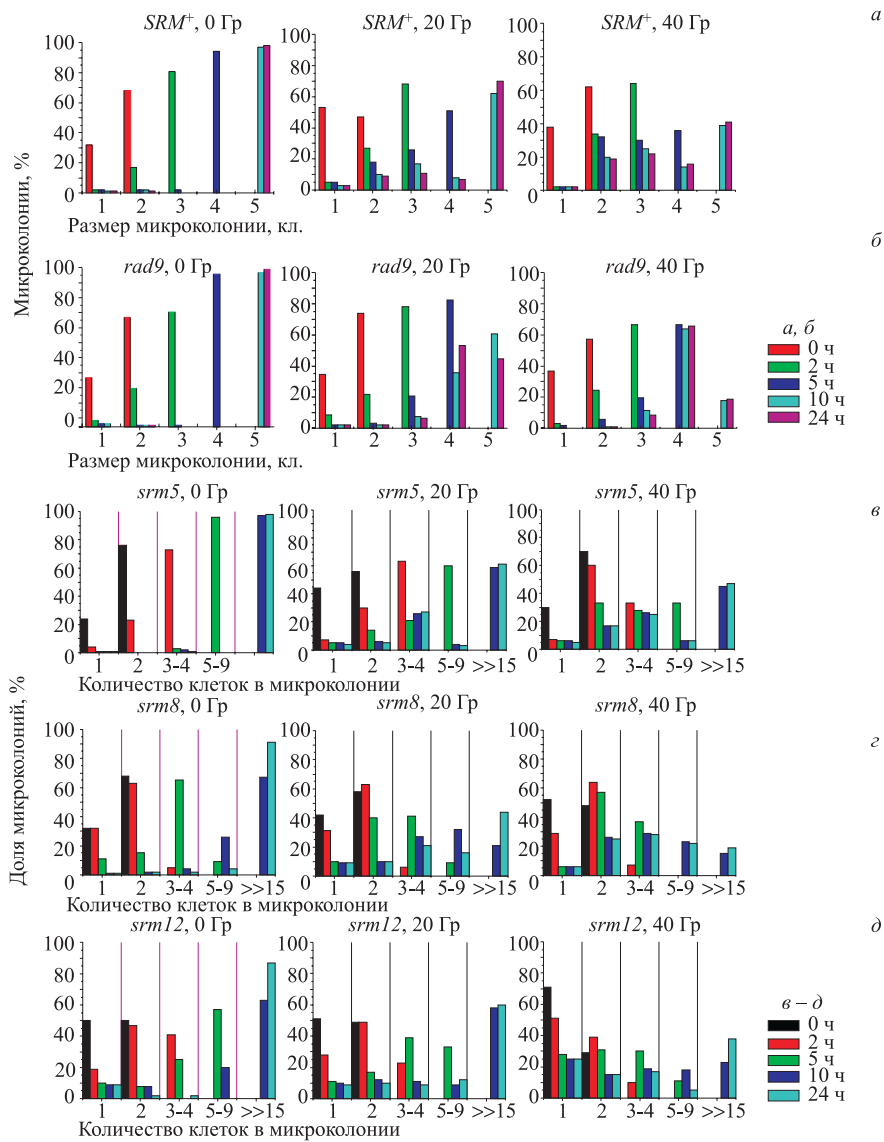


Рис. 6. Кинетика роста микроколоний у гаплоидных клеток, облученных в экспоненциальной фазе роста в дозах 0, 20 и 40 Гр: *SRM+* (а), *rad9* (б), *srm5* (в), *srm8* (з), *srm12* (д)

Таблица 4. Задержка клеточного цикла под действием γ -облучения у штаммов с различным генотипом

Генотип	Доза, Гр	Арест, %	Летальность, %	Арест/летальность, %
<i>SRM</i> ⁺	20	29, 37, 34	27, 36, 37	1,01±0,04
	40	60, 51, 45	62, 60, 60	0,86±0,06
<i>srm5</i>	20	37, 27, 25	36, 26, 32	0,94±0,06
	40	49, 53, 49, 44	69, 61, 53, 42	0,89±0,07
<i>srm8</i>	20	46, 32, 32	56, 45, 46	0,74±0,04
	40	64, 66, 62	82, 70, 81	0,83±0,06
<i>srm12</i>	20	33, 29, 34	40, 30, 32	0,95±0,07
	40	70, 59, 55	62, 62, 61	0,99±0,07
<i>rad9</i>	20	8, 10, 10	61, 59, 59	0,16±0,0
	40	18, 12	87, 80	0,18±0,03

для мутаций *srm* наблюдается стабилизация, т.е. снижение частоты возникновения делеционных мутантов *rho*⁻. Представляло интерес выяснить, влияют ли мутации в известных чекпойнт-генах на стабильность митохондриального генома. Для этого сконструировали гетерозиготы по мутациям *rad9* Δ , *rad17* Δ , *rad24* Δ и *rad53* и отобрали по две тетрады постмейотических потомков. В культурах сегрегантов определяли частоту мутантов *rho*⁻. Как видно из табл. 5, все проанализированные мутации *rad9* Δ , *rad17* Δ , *rad24* Δ и *rad53* в отличие от мутаций *srm* повышают частоту мутантов *rho*⁻. Таким образом, мутации в различных чекпойнт-генах могут иметь противоположный эффект на митохондриальную мутабельность, и снижение мутабельности митохондриального генома у мутантов *srm*, возможно, не связано с нарушением чекпойнт-регуляции.

ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящей работе показано участие у почкующихся дрожжей генов *SRM5/CDC28*, *SRM8/NET1*, *SRM12/HFI1* в работе чекпойнт-регуляции в различных точках клеточного цикла. В процессе работы появились данные других авторов об участии киназы *CDC28* в чекпойнт-регуляции [32, 33], однако участие генов *SRM8/NET1*, *SRM12/HFI1* в различных чекпойнтах у почкующихся дрожжей показано нами впервые.

В данной работе в частности выявлено участие гена *CDC28* во всех чекпойнтах. У дрожжей киназа *CDC28* является основной киназой, участвующей

Таблица 5. Частота спонтанных мутантов *rho*⁻ у гаплоидных сегрегантов

Генотип	Число клонов	Проанализировано колоний	Частота <i>rho</i> ⁻ , %
<i>RAD9</i>	8	3441	39,5±4,9
<i>rad9</i> Δ	8	8215	55,1±8,8
<i>RAD17</i>	7	5279	23,5±5,9
<i>rad17</i> Δ	8	7576	43,1±7,8
<i>RAD24</i>	8	4462	19,8±6,8
<i>rad24</i> Δ	8	4420	23,2±4,9
<i>RAD53</i>	8	6504	22,2±3,4
<i>rad53</i>	8	5989	32,2±6,6

в регуляции клеточного цикла. Протеинкиназа CDC28 относится к семейству циклин-зависимых киназ CDK, для активации которых требуется связывание каталитической субъединицы с циклином. Она активируется девятью циклинами: три G1-циклина (CLN1-CLN3) участвуют в регуляции событий СТАРТА и шесть митотических циклинов (CLB1-CLB6) участвуют в регуляции фазы S и митоза. В клетках человека события клеточного цикла управляются несколькими CDK. Киназы человека CDK1 (CDC2) и CDK2 проявляют высокое сродство к дрожжевой киназе CDC28.

Киназа CDC28 является привлекательной мишенью G1- и G2-чекпойнтов, поскольку принимает участие в регуляции прохождения клеточного цикла и необходима для инициации репликации ДНК и выхода из митоза [34]. Однако механизм ее инактивации и участия в регуляции чекпойнта у дрожжей до сих пор не ясен. Активность циклин-зависимой киназы CDC28 на протяжении клеточного цикла меняется. Использование мутантов или ингибиторов роста [35–37] показало, что активность киназы p34^{CDC28} высока в фазах клеточного цикла G2 и M и низка, но детектируема в фазе G1. При аресте клеток α-фактором в СТАРТе активность p34^{CDC28} чрезвычайно мала (участвуют циклины CLB5, CLB6), увеличивается, по крайней мере, в 20 раз в клетках, арестованных с помощью HU в фазе S (CLB3, CLB4), и возрастает, по крайней мере, в 3 раза в G2-клетках, арестованных беномилом. Таким образом, максимум достигается при переходе G2/M, т. е. соответствует митотическим формам, содержащим преимущественно митотические циклины CLB1 и CLB2.

Для полной активации киназы требуется фосфорилирование треонина T169 [34]. T169 является основным сайтом фосфорилирования каталитической субъединицы киназы p34^{CDC28}. Это фосфорилирование осуществляется единственной киназой Sak1. В литературе нет данных о периодичности фосфорилирования T169. Существуют небольшие общие изменения в уровне фосфорилирования p34^{CDC28} в ответ на арест в фазе G1 при голодании или под действием α -фактора [38], или в процессе клеточного цикла [39], хотя отсутствуют изменения отдельных фракций, связанных с циклинами CLN или CLB [35, 40]. Анализ мутантов показал, что, по-видимому, G1-циклины (CLN) могут активировать нефосфорилированную каталитическую субъединицу киназы p34^{CDC28}, в то время как для активации киназы митотическими циклинами (CLB) требуется фосфорилирование T169 [41].

Для вступления в фазу M у эукариот требуется высокая активность протеинкиназы p34^{CDC2}. У некоторых организмов активация киназы на границе G2/M обусловлена дефосфорилированием высококонсервативного остатка — тирозина Y15 у CDC2. У *S. pombe* степень фосфорилирования тирозина Y15 киназы Cdc2 определяется балансом активностей тирозиновой фосфатазы Cdc25 и киназ Wee1 и Mik1. Для ингибирования p34^{cdc2} в клетках цыпленка важно фосфорилирование двух остатков Y15 и T14 [42]. У дрожжей *S. cerevisiae* треонин T18 киназы p34^{CDC28} (аналог T14 p34^{cdc2}) также подвергается клеточно-регулируемому дефосфорилированию. Тирозин Y19 и, возможно, соседний треонин T18, являются местом действия фосфатазы Mih1. У клеток дикого типа фосфорилированный киназой Swe1 тирозин Y19 обнаруживается в фазах S и G2, но не обнаруживается в фазах G1 и M. Треонин T18 фосфорилируется слабо. T18 и Y19 — единственные остатки p34, фосфорилирование которых возрастает в фазе S [39]. Таким образом, активность p34^{CDC28} высока в фазе S, хотя фосфорилирование Y19 также максимально.

Остановка клеточного цикла, вызванная недорепликацией ДНК, по-видимому, не сопровождается снижением активности p34^{CDC28}. Мутации, предотвращающие фосфорилирование Y19 киназы p34^{CDC28}, не увеличивают киназную активность у S-арестованных клеток и, наоборот, условия, индуцирующие гиперфосфорилирование p34^{CDC28} [43] и арест в фазе G2 [44] (делеция *MIN1* и сверхэкспрессия *wee1*), по-видимому, не снижают киназной активности, как и в случае фазы S. У делеционного мутанта по гену *MIN1* (*MIN1* у *S. cerevisiae* гомологичен *cdc25 S. pombe*) наблюдается гиперфосфорилирование T18 и Y19 p34^{CDC28}. Однако замена тирозина на фенилаланин и треонина на аланин (*cdc28*-[Y19F], *cdc28*-[T18A, Y19F]) не вызывают заметных изменений времени генерации, размера клеток и распределения клеток по стадиям клеточного цикла, определяемых с помощью FACS-анализа. Более того, H1-киназная активность, связанная с G2-специфическим циклином CLB2, не изменена у мутанта F19. Таким образом, статус фосфорилирования

Y19 киназы p34^{CDC28} не важен для зависимости митоза от завершения репликации ДНК. Для G2-остановки не требуется также снижение активности киназы CDC28. Эти данные предполагают, что у *S. cerevisiae* фосфорилирование Y19 может регулировать прохождение клеточного цикла механизмом, который не сводится к падению каталитической активности p34^{CDC28}. Мутации, предотвращающие фосфорилирование p34^{CDC28} по T18 и Y19, не ускоряют митоз и не нарушают чекпойнт-регуляцию, связывающую клеточное деление с завершением синтеза ДНК.

Для делящихся дрожжей *S. pombe* показано, что обработка клеток HU вызывает ингибирование фосфорилирования тирозина Y15 киназы Cdc2. Однако мутационное ингибирование тирозина у почкующихся дрожжей не влияло на S-чекпойнт, а двойная мутация *cdc28*-[Y19F] *rad53* не усиливает HU-летальность мутанта *rad53* [27]. Мутант *cdc28*-[Y19F] не способен к аресту в ответ на действие HU или УФ-облучение [45]. Эти мутации не влияют также на чувствительность к γ -лучам и HU [39, 43], хотя эквивалентный мутант *S. pombe* вступает в митоз преждевременно [46].

Таким образом, в отличие от *S. pombe*, *Xenopus* и клеток млекопитающих дефосфорилирование Y19 не требуется для активации киназы CDC28. Более того, мутационные замены этого остатка не влияют на зависимость митоза от синтеза ДНК, не отменяют G2-арест, индуцированный повреждениями ДНК. По-видимому, фосфорилирование тирозина не является универсальным и существует другой контроль выхода из митоза. У мутанта *cdc28*-[Y19F] киназная активность может ингибироваться Swe1p-зависимым способом, независимым от фосфорилирования тирозина [47]. Мутация *cdc28*-[E12K] приводит к резистентности к Swe1p-опосредованному ингибированию. Мутация *cdc28*-[Y19F], предотвращающая фосфорилирование киназы Cdc28 киназой Swe1, не предотвращает Swe1p-зависимую G2/M-задержку, вызванную гипертоическим шоком [48].

У дрожжей *S. cerevisiae* и *S. pombe* существуют важные различия в функционировании митотической формы киназы CDC28/Cdc2. У *S. pombe* активность киназы Cdc2 имеет пик только перед вступлением в фазу M [49, 50]. Дупликация и миграция полярных телец митотического веретена и образование митотического веретена происходит также в этот период [51]. Однако у почкующихся дрожжей дупликация полярных телец веретена и их сегрегация происходят много раньше в клеточном цикле, вскоре после завершения СТАРТа [52, 53]. Поэтому маловероятно, что эти события инициируются киназой, зависимой от циклинов CLB1 и CLB2, но более вероятно, что эти события инициируются киназой, зависимой от CLN1, CLN2, CLN3.

Учитывая структурные особенности митотического аппарата почкующихся дрожжей, можно предположить, что митоз регулируется в двух точках — сборка веретена контролируется раньше, а контроль митотической сегрегации хромосом осуществляется позже [54]. При этом различные стадии митоза

оркеструются двумя или более формами киназы CDC28. Одна из этих форм, возможно содержащая CLB3 и CLB4, необходима для инициации митоза и образования митотического веретена, другая форма, содержащая CLB1 и CLB2, необходима для завершения митоза [55].

У большинства клеток дупликация, происходящая в интерфазе, сопровождается увеличением размера клетки. Однако у *S. cerevisiae* дочерняя клетка (почка) строится *de novo* отдельно от материнской клетки. Эти процессы требуют серии изменений в полярности роста для созревания почки на поверхности материнской клетки. Показано, что активация комплексов CLB1- и CLB2-CDC28 требуется для включения деполяризованного роста почки в фазе G2 [56]. Киназная активность CLB2-CDC28 необходима для инициации положения почки [57] и переключения от верхушечного к изотропному росту почки [58]. Если эти формы киназы ингибированы (элиминацией циклинов или ингибиторным фосфорилированием тирозина), почки становятся ненормально вытянутыми. Если чекпойнт осуществляется тем же механизмом, что и в клетках *S. pombe* или *Xenopus*, то клетки с ненормальной поверхностью будут образовываться и в условиях, когда клетки ожидают завершения репликации и/или репарации. В случае обработки клеток HU наблюдается иная картина: CLB-CDC28-опосредованное созревание почки происходит как обычно и пара материнская–дочерняя клетки растут в процессе ареста. Возможно, механизм чекпойнт-регуляции у *S. cerevisiae* эволюционировал в сторону завершения CLB-CDC28-опосредованных морфогенетических событий, хотя при этом блокированы ядерные события.

Показано, что диплоид, гомозиготный по мутации *cdc28*-[T18A,Y19F], проявляет дефектность по филаментному росту и сниженную удлиненность клетки [59]. Мутант *cdc28*-[Y19E] не способен к сегрегации дуплицированных полярных телец веретена [60].

Полученная нами мутация *cdc28-srm*-[G20S] влияет на форму клеток и на модель почкования [1]. Кроме того, как показано в настоящей работе, она влияет практически на все чекпойнты. К сожалению, не известно приводит ли эта мутация к изменению киназной активности какой-либо формы. Однако результаты МД-моделирования показали, что замена G20S вызывает сильные изменения конформации самой киназы, ее комплексов с циклинами и субстратом, по-видимому, меняя субстратную специфичность киназы [61].

Ранее была обнаружена мутация *cdc28-5M*, представляющая собой множественные замены (L11H, L183S, S216C, E217K, N232D), которая также нарушала остановку клеточного цикла, индуцированную УФ-повреждениями и нокодазолом, но не гидроксимочевинной HU [32]. Отметим, что одиночные мутации, в том числе [L11H] (локализованная в той же G-богатой петле, что и мутация *cdc28-srm*-[G20S]), не имеют видимых проявлений. У мутанта *cdc-5M* наблюдается снижение киназной активности, включая CLB2-, CLB5-, CLB6-, но не CLB3-ассоциированной CDK-активности. Циклины CLB5 и

CLB6 экспрессируются в СТАРТе и необходимы для инициации S, а циклин CLB2 экспрессируется в G2/M и необходим для митоза. Циклин CLB3 экспрессируется в S/G2 и важен для образования веретена. Таким образом, у мутанта нарушена киназная активность в СТАРТе и митозе, но не в S/G2. Слабый эффект на функционирование чекпойнта обнаружен у мутантных аллелей *cdc28-9* и *cdc28-13*. У мутантов *cdc28-4*, *-9*, *-13*, *-5M* [32], так же как и у мутанта *cdc28-srm* [1], снижена способность поддержания центральной плазмиды.

Мишенью регуляции помимо каталитической субъединицы могут служить циклины. Известно, что сверхэкспрессия циклинов ослабляет проявления дефектов чекпойнта [62]. У дрожжей повреждения ДНК активируют киназу Rad53, которая инактивирует транскрипционный регулятор Swi6, ингибирующий транскрипционный активатор Swi4 транскрипции G1-циклинов (гены CLN). Таким образом, CDK-циклины, в норме необходимые для G1/S-перехода, инактивируются после повреждения молекулы ДНК. У дрожжей остановка в G1/S и G2/M, по-видимому, обеспечивает время для репарации. У млекопитающих остановка в G1/S нужна не для репарации, а скорее для включения альтернативного пути, приводящего к гибели клетки (апоптозу).

Кроме того, активность киназы может меняться тирозин-независимым способом, например за счет синтеза ингибитора CDK — Sic1. Вероятной мишенью является также белок Cks1 [63], гомолог *suc1⁺* *S. pombe*. p13^{suc1}, связываясь с CDC28/циклиновыми комплексами, может менять субстратную специфичность киназы [64]. Хотя биохимическое значение связывания белков p18^{CKS1} и p34^{CDC28} неизвестно, белок Cks1 необходим для переходов G1/S и G2/M [65] и обнаруживается в ассоциации с CDC28 в HU-обработанных клетках [62]. Поскольку мутация *cks1-ts38* супрессирует HU-чувствительность мутанта *rad53*, по-видимому, белок Cks1 осуществляет негативную регуляцию в RAD53-зависимом ингибировании прохождения клеточного цикла [27].

Использование мутации *cdc28-as1* [F88G] показало, что киназа CDC28 необходима для активации ДНР ДНК Mec1p-зависимой остановки клеточного цикла в фазе G2 [33]. К субстратам CDK относятся такие чекпойнт-белки, как Rad9, Drc1/Sld2, Ddc1, Dun1 и Ptc3 [66–68]. Для активации чекпойнт-контроля необходимы деградация концов двуникового разрыва ДНК, загрузка RPA на участок однострессовой ДНК и последующая загрузка киназы Mec1 [69, 70]. Ингибирование киназной активности CDC28 нарушает активацию остановки, индуцированной двуниевым разрывом ДНК, но не существенно для других повреждений, индуцирующих Mec1p-зависимую активацию чекпойнт-контроля. Предполагается, что CDC28 влияет на активацию Mec1p-зависимой остановки только в случае, если повреждение представляет собой двуниевую разрыв ДНК, нуждающийся в деградации для образования однострессовой ДНК.

Помимо активации чекпойнта киназа CDC28 участвует на финальных этапах регуляции остановки клеточного цикла. Для выхода из митоза и завершения клеточного цикла требуется инактивация киназы CDC28/CLB2. Протеасома APC^{Cdc20} опосредует убиквитинизацию и разрушение анафазного ингибитора Pds1, а также регулирует первый уровень разрушения циклина CLB2, приводящий к активации сети MEN (*mitotic exit network*), которая регулирует выход из митоза. Активация APC^{Hct1/Cdh1} и синтез ингибитора CDC28 (Sic1) позволяют осуществить дальнейшую инактивацию комплекса CDC28/CLB2. При задержке клеточного цикла в фазе G2/M киназа RAD53 поддерживает высокую активность киназы CDC28 через ингибирование киназы CDC5, которая необходима для деградации циклинов и выхода из митоза [71]. Киназа RAD53 участвует в киназном каскаде передачи сигнала посредством киназы DUN1, ингибируя деградацию CLB2 и выход из митоза, блокируя активацию MEN-комплекса. Однако в наших экспериментах у мутанта *cdc28-srm* не выявлено нарушение G2-чекпойнта, индуцированного γ -излучением.

Активность CDC28 не нужна для активации чекпойнта предсуществующими интермедиатами однокитевой ДНК в процессе эксцизионной репарации нуклеотидов. Однако мы наблюдали снижение задержки при УФ-облучении культур, синхронизованных в фазах G0 или G1. По нашим данным, мутация *cdc28-srm* не влияет на S-арест под действием HU, но влияет на intra S-чекпойнт. В другой работе показано, что ингибирование киназной активности CDC28 не влияет на активацию чекпойнта в ответ на арест S-фазы, вызванный HU, в процессе которого возникают участки однокитевой ДНК в застрявших репликативных вилках [72]. Таким образом, киназа CDC28, участвующая в активации синтеза ДНК и переходе из фазы G1 в фазу S, участвует в G1/S-чекпойнте, но не нужна на стадии, когда репликация уже началась, например, при ингибировании репликации HU.

Таким образом, киназа CDC28 принимает активное участие в прохождении клеточного цикла, обеспечивая активацию транскрипции соответствующих генов или осуществляя активационное фосфорилирование белков, и служит мишенью чекпойнт-регуляции. Кроме того, она принимает участие на начальных этапах активации остановки, фосфорилируя белки, участвующие в репарации, рекомбинации и чекпойнте. Активность киназы, по-видимому, регулируется не только статусом фосфорилирования каталитической субъединицы, но и на уровне синтеза циклинов и/или ингибитора.

Нами впервые показано участие в чекпойнт-регуляции кроме киназы CDC28 генов *NET1* и *HF11*. *HF11/SRM12/ADA1* входит в состав коактиваторов транскрипции SAGA и GCN5/ADA, обладающих гистонацетилазной активностью НАТ (*histone acetyltransferase*) [73]. Однако ацетилаза Gcn5, входящая в состав этих комплексов, функционирует не только как коактиватор транскрипции, но и осуществляет еще глобальное ацетилирование гистонов по всему геному [74]. В последнее время становится очевидным, что

ацетилирование/деацетилирование гистонов играет регуляторную роль в репарации и в контроле чекпойнт-остановки. Например, утрата ацетилированных лизинов Lys5, 8, 12 и 16 гистона H4 или нарушение Esa1p, компонента НАТ-комплекса NuA4 активируют RAD9-зависимый G2/M-чекпойнт [75–77]. Разрушение гистондеацетилтрансферазы HDAC (*histone deacetyltransferase*) Sin3/Rpd3 восстанавливает G2/M-арест клеточного цикла после УФ-облучения у чекпойнт-дефектных штаммов [78], и это восстановление зависит от интактного MAD1-зависимого чекпойнт-контроля веретена. Гистондеацетилтрансфераза Sin3/Rpd3 также регулирует время репликации поздних *ori* и участвует в *intra S*-чекпойнте [79]. Известны данные об участии ацетилирования/деацетилирования негистоновых белков в контроле апоптоза и радиочувствительности клеток человека [80–84]. Белок hADA3, входящий в состав НАТ-комплексов, является кофактором активации транскрипционного фактора p53 [85], участвующего в G1-аресте и апоптозе. Ацетилирование p53 ацетилтрансферазой PCAF/yGCN5 регулирует активность p53 в процессе ответа на повреждения ДНК [80–82, 86, 87]. p53-опосредованный регуляторный путь также опосредуется NAD-зависимым деацетилированием гистонов деацетилазой Sir2 α [83, 84].

Изучение роли продуктов генов *CDC28*, *NET1* и *HFI1* в чекпойнт-регуляции вызывает несомненный интерес и требует дальнейших исследований. Представляет интерес изучение взаимодействия между продуктами этих генов. Недавно обнаружили связь между киназой CDC28 и НАТ-активностью, а именно, показано, что фосфорилирование гистона H3 по серину Ser10 киназой Snf1 облегчает дальнейшее ацетилирование лизина Lys14 ацетилазой Gcn5 [88, 89]. Негативный регулятор Sip2 киназы Snf1 (субъединица комплекса SWI/SNF) является субстратом протеинкиназы CDC28 [66]. Кроме того, субстратами киназы CDC28 являются белки транскрипционных комплексов TFG1 (TFIIF), TAF4 (TFIID), NGG1 (SAGA), SPT16 [66], причем SPT16 связывается с НАТ-комплексом NuA3 [90].

Авторы приносят благодарность Т. Н. Базловой за техническую помощь и А. Б. Девину за сконструированные штаммы и обсуждение полученных результатов.

ЛИТЕРАТУРА

1. 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.
2. 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.

3. Koltovaya N.A., Guerasimova A.S., Tchekhouta I.A., Devin A.B. *NET1* and *HF11* genes of yeast mediate both chromosome maintenance and mitochondrial rho⁻ mutagenesis // *Yeast*. 2003. V. 20. P. 955–971.
4. Weinert T.A., Hartwell L.H. The *RAD9* gene controls the cell cycle response to DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae* // *Science*. 1988. V. 241. P. 317–322.
5. Chiolo I., Carotenuto W., Maffioletti G., Petrini 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.
6. Michelson R.J., Weinert T. Closing the gaps among a web of DNA repair disorders // *BioEssays*. 2000. V. 22. P. 966–969.
7. Tercero J.A., Diffley J.F. Regulation of DNA replication fork progression through damaged DNA by the Mec/Rad53 checkpoint // *Nature*. 2001. V. 412. P. 553–557.
8. Painter R.B., Young B.R. Radiosensitivity in ataxia-telangiectasia: a new explanation // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1980. V. 77. P. 7315–7317.
9. Shirahige K., Hori Y., Shiraishi K., Yamashita M., Takahashi K., Obuse C., Tsurimoto T., Yoshikawa H. Regulation of DNA-replication origins during cell-cycle progression // *Nature*. 1998. V. 395. P. 618–621.
10. Paulovich A.G., Margulies R.U., Garvik B.M., Hartwell L.H. *RAD9*, *RAD17*, and *RAD24* are required for S phase regulation in *Saccharomyces cerevisiae* in response to DNA damage // *Genetics*. 1997. V. 145. P. 45–62.
11. Lowndes N.F., Murguia J.R. Sensing and responding to DNA damage // *Curr. Opin. Genet. Devel.* 2000. V. 10. P. 17–25.
12. Santocanale C., Diffley J.F.X. A Mec1- and Rad53-dependent checkpoint controls late-firing origins of DNA replication // *Nature*. 1998. V. 395. P. 615–618.
13. Hartwell L. Defects in a cell cycle checkpoint may be responsible for the genomic instability of cancer cells // *Cell*. 1992. V. 71. P. 543–546.
14. Zhou B.B., Elledge S.J. The DNA damage response: putting checkpoints in perspective // *Nature*. 2000. V. 408. P. 433–439.
15. Myung K., Datta A., Kolodner R.D. Suppression of spontaneous chromosomal rearrangements by S phase checkpoint functions in *Saccharomyces cerevisiae* // *Cell*. 2001. V. 104. P. 397–408.
16. Myung K., Kolodner R.D. Suppression of genome instability by redundant S-phase checkpoint pathways in *Saccharomyces cerevisiae* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2002. V. 99. P. 4500–4507.

17. 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.
18. Колтовая Н.А., Кадышевская Е.Ю. Ген *CDC28* и контроль клеточного цикла у дрожжей-сахаромисетов // Докл. РАН. 1997. Т. 357 С. 710–712.
19. Колтовая Н.А., Карташева Н.Н., Кадышевская Е.Ю., Чехута И.А., Синеокая И.В., Смирнова М.Е., Шванева Н.В., Арман И.П., Девин А.Б. *SRM8* и *SRM12* – два гена *RAD9*-зависимого пути, контролирующего радиочувствительность *Saccharomyces cerevisiae* // Докл. РАН. 1998. Т. 360. С. 420–422.
20. Колтовая Н.А., Девин А.Б. О роли некоторых checkpoint-генов в определении радиочувствительности дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* // Докл. РАН. 2002. Т. 387. С. 1–4.
21. Колтовая Н.А., Никулушкина Ю.В., Кадышевская Е.Ю., Рощина М.П., Девин А.Б. Взаимодействие чекпойнт-генов *RAD9*, *RAD17*, *RAD24*, *RAD53* с генами *SRM5/CDC28*, *SRM8/NET1* и *SRM12/HF11* в определении чувствительности дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* к действию ионизирующей радиации // Генетика. 2007. в печ.
22. Sherman F., Fink G.R., Hicks J.B. Laboratory course manual for methods in yeast genetics // Cold Spring Harbor Laboratory. 1986. N. Y.
23. Siede W., Friedberg E. C. Influence of DNA repair deficiencies on the UV sensitivity of yeast cells in different cell cycle stages // Mutation Res. 1990. V. 245. P. 287–292.
24. Siede W., Friedberg A. S., Friedberg E. C. *RAD9*-dependent G1 arrest defines a second checkpoint for damaged DNA in the cell cycle of *Saccharomyces cerevisiae* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1993. V. 90. P. 7985–7989.
25. Siede W., Friedberg A. S., Dianova I., Friedberg E. C. Characterization of G1 checkpoint control in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* following exposure to DNA damaging agents // Genetics. 1994. V. 138. P. 271–281.
26. Longhese M. P., Frashini R., Plevano P., Lucchini G. Yeast *pip3/mec3* mutants fail to delay entry into S phase and to slow DNA replication in response to DNA damage, and they define a functional link between Mec3 and DNA primase // Mol. Cell. Biol. 1996. V. 16. P. 3235–3244.
27. Allen J.B., Zhou Z., Siede W., Friedberg E. C., Elledge S.J. The *SAD1/RAD53* protein kinase controls multiple checkpoints and DNA damage-induced transcription in yeast // Genes Dev. 1994. V. 8. P. 2401–2415.
28. Navas T. A., Sanchez Y., Elledge S. J. *RAD9* and DNA polymerase ϵ form parallel sensory branches for transducing the DNA damage checkpoint signal in *Saccharomyces cerevisiae* // Genes Dev. 1996. V. 10. P. 2632–2643.

29. Weinert T.A., Kiser G.L., Hartwell L.H. Mitotic checkpoint genes in budding yeast and the dependence of mitosis on DNA replication and repair // *Genes Dev.* 1994. V. 8. P. 652–665.
30. Johnston L.H., Nasmyth K.A. *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle mutant *cdc9* is defective in DNA ligase // *Nature.* 1978. V. 274. P. 981–893.
31. Weinert T.A., Hartwell L.H. Cell cycle arrest of *cdc* mutants and specificity of the *RAD9* checkpoint // *Genetics.* 1993. V. 134. P. 63–80.
32. Li X., Cai M. Inactivation of the cyclin-dependent kinase Cdc28 abrogates cell cycle arrest induced by DNA damage and disassembly of mitotic spindles in *Saccharomyces cerevisiae* // *Mol. Cell. Biol.* 1997. V. 17. P. 2723–2734.
33. Ira G., Pellicoli 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.
34. Mendenhall M.D., Hodge A.E. Regulation of Cdc28 cyclin-dependent protein kinase activity during the cell cycle of the yeast // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 1998. V. 62. P. 1191–1243.
35. Wittenberg C., Reed S.I. Control of the yeast cell cycle is associated with assembly/disassembly of the Cdc28 protein kinase complex // *Cell.* 1988. V. 54. P. 1061–1072.
36. Mendenhall M.D., Jones C.A., Reed S.I. Dual regulation of the yeast CDC28-p40 protein kinase complex: cell cycle, pheromone, and nutrient limitation effects // *Cell.* 1987. V. 50. P. 927–935.
37. Langan T.A., Gautier J., Lohka M., Hollingsworth R., Moreno S., Nurse P., Maller J., Sclafani R.A. Mammalian growth-associated H1 histone kinase: a homolog of *cdc2⁺/CDC28* protein kinases controlling mitotic entry in yeast and frog cells // *Mol. Cell. Biol.* 1989. V. 9. P. 3860–3868.
38. Hadwiger J.A., Reed S.I. Invariant phosphorylation of the *Saccharomyces cerevisiae* Cdc28 protein kinase // *Mol. Cell. Biol.* 1988. V. 8. P. 2976–2979.
39. Amon A., Surana U., Muroff I., Nasmyth K. Regulation of p34^{CDC28} tyrosine phosphorylation is not required for entry into mitosis in *S. cerevisiae* // *Nature.* 1992. V. 355. P. 368–371.
40. Wittenberg C., Sugimoto K., Reed S.I. G1-specific cyclins of *S. cerevisiae*: cell cycle periodicity, regulation by mating pheromone, and association with the p34^{CDC28} protein kinase // *Cell.* 1990. V. 62. P. 225–37.
41. Cross F.R., Lewin K. Molecular evolution allows bypass of the requirement for activation loop phosphorylation of the Cdc28 cyclin-dependent kinase // *Mol. Cell. Biol.* 1998. V. 18. P. 2823–2931.

42. *Krek W., Nigg E.A.* Mutations of p34^{cdc2} phosphorylation sites induce premature mitotic events in HeLa cells: evidence for a double block to p34^{cdc2} kinase activation in vertebrates // *EMBO J.* 1991. V. 10. P. 3331–3341.
43. *Sorger P.K., Murray A.W.* S-phase feedback control in budding yeast independent of tyrosine phosphorylation of p34^{cdc28} // *Nature.* 1992. V. 355. P. 365–368.
44. *Russell P., Moreno S., Reed S.I.* Conservation of mitotic controls in fission and budding yeasts // *Cell.* 1989. V. 57. P. 295–303.
45. *Lim H.H., Surana U.* Cdc20, a beta-transducin homologue, links RAD9-mediated G2/M checkpoint control to mitosis in *Saccharomyces cerevisiae* // *Mol. Gen. Genet.* 1996. V. 253. P. 138–148.
46. *Gould K.L., Nurse E.A.* Tyrosine phosphorylation of the fission yeast cdc2⁺ protein kinase regulates entry into mitosis // *Nature.* 1989. V. 342. P. 39–45.
47. *McMillan J.N., Sia R.A.L., Bardes E.S.G., Lew D.J.* Phosphorylation-independent inhibition of Cdc28p by the tyrosine kinase Swe1p in the morphogenesis checkpoint // *Mol. Cell. Biol.* 1999. V. 19. P. 5981–5990.
48. *Alexander M.R., Tyers M., Perret M., Craig B.M., Fang K.S., Gustin M.C.* Regulation of cell cycle progression by Swe1p and Hog1p following hypertonic stress // *Mol. Biol. Cell.* 2001. V. 12. P. 53–62.
49. *Booher R.N., Alfa C.E., Hyams J.S., Beach D.H.* The fission yeast cdc2/cdc13/suc1 protein kinase: regulation of catalytic activity and nuclear localization // *Cell.* 1989. V. 58. P. 485–497.
50. *Moreno S., Hayles J., Nurse P.* Regulation of p34^{cdc2} protein kinase during mitosis // *Cell.* 1989. V. 58. P. 361–372.
51. *Hagan I.M., Hyams J.S.* The use of cell division cycle mutants to investigate the control of microtubule distribution in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* // *J. Cell Sci.* 1988. V. 89. P. 343–357.
52. *Byer B., Goetsch L.* Duplication of spindle plaques and integration of the yeast cell cycle // *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 1974. V. 38. P. 123–131.
53. *Pringle J.R., Hartwell L.H.* The *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle, In: The molecular biology of the yeast *Saccharomyces*. Life cycle and inheritance. Strathern JN, Jones EW, Broach JR (Eds.). Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor. NY. 1981. P. 97–142.
54. *Reed S.I., Wittenberger C.* Mitotic role for the Cdc28 protein kinase of *Saccharomyces cerevisiae* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1990. V. 87. P. 5697–5701.
55. *Surana U., Robitsch H., Price C., Schuster T., Fitcher A.B., Nasmyth K.* The role of CDC28 and cyclins during mitosis in the budding yeast *S. cerevisiae* // *Cell.* 1991. V. 65. P. 145–161.

56. Lew D.J., Reed S.I. Morphogenesis in the yeast cell cycle: regulation by Cdc28 and cyclins // *J. Cell Biol.* 1993. V. 120. P. 1305–1320.
57. Padmashree C.G., Surana U. Cdc28-Clb mitotic kinase negatively regulates bud site assembly in the budding yeast // *J. Cell Sci.* 2001. V. 114. P. 207–218.
58. Sheu Y.J., Barral Y., Snyder M. Polarized growth controls cell shape and bipolar bud site selection in *Saccharomyces cerevisiae* // *Mol. Cell. Biol.* 2000. V. 20. P. 5235–5247.
59. Ahn S.H., Acurio A., Kron S.J. Regulation of G2/M progression by the STE mitogen-activated protein kinase pathway in budding yeast filamentous growth // *Mol. Biol. Cell.* 1999. V. 10. P. 3301–3316.
60. Lim H.H., Goh P.-Y., Surana U. Spindle pole body separation in *Saccharomyces cerevisiae* requires dephosphorylation of the tyrosine 19 residue of Cdc28 // *Mol. Cell. Biol.* 1996. V. 16. P. 6385–6397.
61. Кретов Д.А., Холмуродов Х.Т., Колтовая Н.А. Анализ связей между АТФ и каталитической субъединицей киназы (нативной и мутантной) с помощью МД-моделирования кристаллической решетки активной киназы CDK2 // *Жур. Физ. Хим.* 2007. т. 10. С. 1–6.
62. Stueland C.S., Lew C.S., Cismowski M.J., Reed S.I. Full activation of p34^{CDC28} histone H1 kinase activity is unable to promote entry into mitosis in checkpoint-arrested cells of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* // *Mol. Cell. Biol.* 1993. V. 13. P. 3744–3755.
63. Hadwiger J.A., Wittenberg C., Mendenhall M.D., Reed S.I. The *Saccharomyces cerevisiae* *CKS1* gene, a homolog of the *Schizosaccharomyces pombe* *suc1*⁺ gene, encodes a subunit of the Cdc28 protein kinase complex // *Mol. Cell. Biol.* 1989. V. 9. P. 2034–2041.
64. Kusubata M., Tokui T., Matsuoka Y., Okumura E., Tachibana K., Hisanaga S., Kishimoto T., Yasuda H., Kamijo M., Ohba Y., Tsujimura K., Yatani R., Inagaki M. p31^{suc1} suppresses the catalytic function of p34^{cdc2} kinase for intermediate filament proteins, *in vivo* // *J. Biol. Chem.* 1992. V. 267. P. 20937–20942.
65. Tang Y., Reed S.I. The Cdk-associated protein Cks1 functions both in G1 and G2 in *Saccharomyces cerevisiae* // *Genes Dev.* 1993. V. 7. P. 822–832.
66. 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.
67. Toh G.W., Lowndes N.F. Role of the *Saccharomyces cerevisiae* Rad9 protein in sensing and responding to DNA damage // *Biochem. Soc. Trans.* 2003. V. 31. P. 242–246.

68. Masumoto H., Muramatsu S., Kamimura Y., Araki H. S-Cdk-dependent phosphorylation of Sld2 essential for chromosomal DNA replication in budding yeast // *Nature*. 2002. V. 415. P. 651–655.
69. Lee S.E., Moore J.K., Holmes A., Umez K., Kolodner R.D., Haber J.E. Ku70, Mre11/Rad50 and RPA proteins regulate adaptation to G2/M arrest after DNA damage // *Cell*. 1998. V. 94. P. 399–409.
70. 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.
71. Sanchez Y., Bachant J., Wang H., Hu F., Liu D., Tetzlaff M., Elledge S.J. Control of the DNA damage checkpoint by chk1 and rad53 protein kinases through distinct mechanisms // *Science*. 1999. V. 286. P. 1166–1171.
72. Liberi G., Chiolo I., Pellicoli 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.
73. 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.
74. Imoberdorf R.M., Topalidou I., Strubin M. A role for Gcn5-mediated global histone acetylation in transcriptional regulation // *Mol. Cell. Biol*. 2006. V. 26. P. 1610–1616.
75. Megee P. C., Morgan B. A., Mittman B. A., Smith M. M. Genetic analysis of histone H4: essential role of lysines subject to reversible acetylation // *Science*. 1990. V. 247. P. 841–845.
76. Megee P. C., Morgan B. A., Smith M. M. Histone H4 and the maintenance of genome integrity // *Genes Dev*. 1995. V. 9. P. 1716–1727.
77. Clarke A. S., Lowell J. E., Jacobson S. J., Pillus L. Esa1p is an essential histone acetyltransferase required for cell cycle progression // *Mol. Cell. Biol*. 1999. V. 19. P. 2515–2526.
78. Scott K. L., Plon S. E. Loss of Sin3/Rpd3 histone deacetylase restores the DNA damage response in checkpoint-deficient strains of *Saccharomyces cerevisiae* // *Mol. Cell. Biol*. 2003. V. 23. P. 4522–4531.
79. Aparicio J. G., Viggiani C. J., Gibson D. G., Aparicio O. M. The Rpd3-Sin3 histone deacetylase regulates replication timing and enables intra-S origin control in *Saccharomyces cerevisiae* // *Mol. Cell. Biol*. 2004. V. 24. P. 4769–4780.
80. 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.

81. 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.
82. 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.
83. 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.
84. 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.
85. Wang T., Kobayashi T., Takimoto R., Denes A. E., Snyder E. L., el-Deiry W. S., Brachmann R. K. hADA3 is required for p53 activity // *EMBO J.* 2001. V. 20. P. 6404–6413.
86. 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.
87. 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.
88. Lo W. S., Duggan L., Emre N. C., Belotserkovskaya R., Lane W. S., Shiekhattar R., Berger S. L. Snf1 — a histone kinase that works in concert with the histone acetyltransferase Gcn5 to regulate transcription // *Science.* 2001. V. 293. P. 1142–1146.
89. Clements A., Poux A. N., Lo W. S., Pillus L., Berger S. L., Marmorstein R. Structural basis for histone and phosphohistone binding by the GCN5 histone acetyltransferase // *Mol. Cell.* 2003. V. 12. P. 461–473.
90. John S., Howe L., Tafrov S. T., Grant P. A., Sternglanz R., Workman J. L. The something about silencing protein, Sas3, is the catalytic subunit of NuA3, a γ TAF(II)30-containing HAT complex that interacts with the Spt16 subunit of the yeast CP (Cdc68/Pob3)-FACT complex // *Genes Dev.* 2000. V. 14. P. 1196–208.

Получено 2 ноября 2007 г.

Редактор *М. И. Зарубина*

Подписано в печать 30.01.2008.

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

Усл. печ. л. 2,25. Уч.-изд. л. 2,70. Тираж 220 экз. Заказ № 56037.

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

E-mail: publish@jinr.ru

www.jinr.ru/publish/